

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Institut für Zellbiologie (Tumorforschung)

Komposition und Komplexität humaner Gedächtnis-B-Zell-Populationen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Stefanie Schweigle de Reynoso
aus Frankfurt am Main

2014

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1.Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. R. Küppers

2.Gutachter: Herr Prof. Dr. med. J. Dürig

Tag der mündlichen Prüfung: 28. April 2015

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	5
1.1 Das Immunsystem	5
1.2 Die B-Zelle	6
1.3 Die Keimzentrumsreaktion	9
1.4 T-Zell-unabhängige Immunantworten	13
1.5 Die Gedächtnis-B-Zellen	14
1.6 Zielsetzung	16
Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Laborgeräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Nährmedien, Puffer und Lösungen	18
2.1.4 Oligonukleotide	19
2.1.5 Antikörper	21
2.1.6 Computersoftware und Internetadressen	21
2.2 Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1 Isolierung humanen Gedächtnis-B-Zell-Populationen	22
2.2.1.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	22
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl	22
2.2.1.3 MACS	23
2.2.1.4 Durchflusszytometrie	23
2.2.2 RNA Isolierung	25
2.2.3 cDNA Synthese	25
2.2.4 V-Gen-PCR	26
2.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten	27
2.2.6 DNA-Gelelektrophorese	27
2.2.7 Klonierung	28
2.2.7.1 Anhängen von Adenin (<i>engl.: A- Adding</i>)	28
2.2.7.2 DNA-Ligation	29
2.2.7.3 Transformation	29
2.2.7.4 Plasmidpräparation	29
2.2.8 DNA Sequenzierung nach Sanger	30

2.2.9 Herstellung einer Amplicon Libery	31
2.2.10 Next-Generation-Sequencing mit Roche 454 GS-FLX+ Titanium	33
2.3 Bioinformatische Auswertung	35
2.3.1 Bestimmung der IgG-Unterklassen	35
2.3.2 CDRIII Länge	35
2.3.3 Mutationsfrequenz	35
2.3.4 R/S Werte	36
2.3.5 Berechnung klonal verwandter Sequenzen	36
2.3.6 Erstellung und Analyse genealogischer Bäume	37
Ergebnisse	38
3.1 Prozessierung der NGS Daten	39
3.2 Die V _H -Gen Nutzung der Gedächtnis-B-Zell-Populationen	43
3.3 Die CDRIII-Länge der Gedächtnis-B-Zell-Populationen	47
3.4 Die Mutationsfrequenz der Gedächtnis-B-Zell-Populationen	49
3.5 Die R/S-Werte der Gedächtnis-B-Zell-Populationen	51
3.6 Klonale Verwandtschaft von B-Zell-Populationen	52
3.7 Genealogische Bäume von Gedächtnis-B-Zell-Populationen	56
3.8 Die IgG-Unterklassenverwendung der Gedächtnis-B-Zell-Populationen	60
Diskussion	65
4.1 V _H -Gen Analyse von Gedächtnis-B-Zell-Populationen	65
4.2 Klonale Verwandtschaft von Gedächtnis-B-Zell-Populationen	68
4.3 Die IgG ⁺ Gedächtnis-B-Zell-Populationen	72
4.4 Abschließende Diskussion und Ausblick	73
Zusammenfassung	75
Literaturverzeichnis	76
Abbildungsverzeichnis	83
Tabellenverzeichnis	84
Abkürzungsverzeichnis	85
Danksagung	87
Lebenslauf	88

EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist für die Abwehr von körperfremden Substanzen (Krankheitserregern) zuständig und somit Schutzschild des Organismus. Es wird unterteilt in die angeborene (native) und die erworbene (adaptive) Immunität. Die angeborene Immunität bedient sich keimbahnkodierter Rezeptoren für die Erkennung von Pathogenen und bildet die erste Abwehr. Sie reagiert sofort, kann aber Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion entwickeln. Bei der adaptiven Immunantwort vermehren sich antigen-spezifische Lymphozyten und differenzieren zu Effektorzellen, welche die Krankheitserreger vernichten. Gleichzeitig wird bei einer Infektion durch klonale Selektion eine erhöhte Zahl ausdifferenzierter Gedächtniszellen erzeugt; diese ermöglichen bei einer erneuten Infektion eine schnellere und wirksamere Reaktion gegen das fremde Antigen. Die Rezeptorvielfalt entsteht durch die zufällige Kombination von variablen Rezeptorsegmenten und der paarweisen Zusammenlagerung verschiedener Rezeptorketten. Dadurch kann eine so große Zahl unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren zur Verfügung gestellt werden, so dass theoretisch jedes fremde Antigen erkannt wird; wobei die einzelnen Lymphozyten an ihrer Oberfläche stets nur Rezeptoren einer Spezifität tragen. Es gibt zwei Hauptgruppen von Lymphozyten: T-Zellen (*engl.: T = thymus*) und B-Zellen (*engl.: B = bone marrow*). B-Zellen und T-Zellen verwenden unterschiedliche, aber strukturell ähnliche Moleküle zur Erkennung von Antigenen.

Die B-Zellen unterteilen sich weiter grob in naive B-Zellen und in antigenerfahrene Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen. Sie tragen auf ihrer Oberfläche Immunglobuline, die als Antigenrezeptoren der Zelle dienen und in ihrer membrangebundenen Form als B-Zell-Rezeptoren (BCR) bezeichnet werden. Nach einer Aktivierung können die B-Zellen diese Immunglobuline als lösliche Antikörper sezernieren und so eine Bekämpfung der Krankheitserreger in den extrazellulären Bereichen des Körpers ermöglichen. Die Diversität der B-Zell-Rezeptoren wird durch verschiedene molekulare Mechanismen erzielt: die Verbindung der V(D)J-Gensegmente zur variablen Regionen, auch V-Region (*engl.: variable = V*) genannt, die Hypermutation der umgeordneten V(D)J-Gene und der Wechsel des Isotyps des Immunglobulins.

T-Zellen verfügen über Rezeptoren, die als T-Zell-Rezeptoren (TCR) bezeichnet werden. Sie sind hochvariable Antigenerkennungsstrukturen, die Peptidfragmente intrazellulärer Krankheitserreger erkennen. Die Peptide der Krankheitserreger werden den T-Zellen auf

Einleitung

der Zelloberfläche von Antigen präsentierenden Zellen (*engl. Antigen presenting cells = APC*) durch die Glykoproteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, die Peptidfragmente zwei verschiedenen Typen von T-Effektorzellen präsentieren. MHC-I wird mit Peptidfragmenten intrazellulärer Erreger im endoplasmatischen Retikulum (ER) beladen und präsentiert diese den zytotoxischen T-Zellen. MHC-II wird mit Peptidfragmenten extrazellulärer Erreger, die aus Endosomen stammen, beladen und präsentiert diese den T-Helferzellen (T_H-Zellen). T_H-Zellen können anschließend Makrophagen und B-Zellen aktivieren. (Janeway, 2002).

1.2 Die B-Zelle

Der B-Zell-Rezeptor ist ein Homodimer und besteht aus je zwei schweren und zwei leichten Rezeptorproteinketten, die über Disulfidbindungen verbunden sind. In jeder Kette ist eine variable Region mit einer unveränderlichen konstanten C-Region (*engl.: constant = C*) verknüpft, welche die Effektorfunktion übernimmt. Variable Regionen werden von mehreren Stücken, den sogenannten Gensegmenten, codiert. Die variable Region der leichten Kette (*engl. light = L*) wird von zwei verschiedenen DNA-Abschnitten, dem V_L-Gen-Segment (*engl. Variable = V*) und dem J_L-Gen-Segment (*engl. Joining = J*); die schweren Kette (*engl. heavy = H*) wird dagegen von drei verschiedenen DNA-Abschnitten codiert, dem V_H-Gen-Segment, dem D_H-Gen-Segment (*engl. diversity = D*) und dem J_H-Gen-Segment. Jeder Typ dieser Gensegmente ist in mehreren Kopien (Allele) in der Keimbahn vorhanden, wobei die Auswahl des Gensegments zufällig geschieht. Die menschlichen V-Gen-Segmente lassen sich in Familien einteilen, deren Mitglieder mindestens 80% der Basenfolge gemeinsam haben. V-Gen-Segmente der schweren Kette bestehen aus sieben solcher Familien. Die Immunglobulin-Gensegmente liegen gekoppelt in drei genetischen Loci vor; den schwere Ketten Locus (IgH) und den κ- (Igκ) und λ-Locus (Igλ) der leichten Kette. V-Regionen bilden drei hypervariable Schleifen (*engl. complementarity determining region = CDR*) in der Proteinkette des Immunglobulins. CDR1 und CDR2 sind innerhalb eines V-Gen-Segments codiert, die CDR3 liegt im Bereich der Verknüpfungssequenz zwischen dem V- und J-Gensegment und wird bei der schweren Kette ebenfalls vom D-Gen-Segment codiert. Die Abschnitte zwischen den CDRs, die den Rest der V-Region bilden, werden als Gerüstregionen, FR (*engl.: framework region*) bezeichnet. Sie sind für die Form und Stabilität des Immunglobulins verantwortlich. Die C-Region der schweren Kette wird von mehreren Exons codiert. Die Exons der C-Region

werden während der Prozessierung des RNA-Transkripts der schweren Kette zusammen mit der Leader-Sequenz (L) an die Sequenzen der V(D)J-Gene gespleißt. Der IgH Locus kodiert für fünf unterschiedlicher C-Regionen, den sogenannten Isotypen, die nacheinander auf dem Locus angeordnet sind (Janeway, 2002).

Die Umlagerung der Gensegmente in der V(D)J-Region findet während der Reifung der B-Lymphozyten im pro- und prä-B-Zell-Stadium statt. Der Umlagerungsmechanismus ist eine somatische DNA-Rekombination, dabei werden einzelne Gensegmente zu einem V-Gen rekombiniert. Diese Umlagerung der V-, D- und J-Segmente der schweren Kette wird durch flankierende DNA-Sequenzen gesteuert, die evolutionär von Transposons abgeleitet sind (Abbildung: 1.1). Direkt auf die kodierende Sequenz folgt ein Heptamer, eine konservierte Reihenfolge von sieben Nukleotiden. Daran schließt sich ein Abstandhalter (*engl.: spacer*) an, eine nicht-konservierte Reihenfolge von 12 oder 23 Nukleotiden; gefolgt von einem Nonamer, eine weitere konservierte Reihenfolge von neun Nukleotiden. Diese Struktur „Heptamer-Abstandhalter-Nonamer“ wird als Rekombinationssignalsequenz (RSS) bezeichnet. Die Genumlagerung folgt einer sogenannten 12/23-Regel. Ein Gensegment, das von einer RSS mit einem 12 Basenpaar langen Abstandhalter flankiert wird, kann nur mit einem Gensegment verknüpft werden, das von einer RSS mit 23 Basenpaar langem Abstandhalter flankiert wird. Für diese Umlagerung der V-Region der schweren Kette sind zwei Fusionsereignisse notwendig. V_H-Gen-Segmente werden am 3'-Ende und J_H-Gen-Segmente am 5'-Ende von 23 Basenpaar Abstandhaltern flankiert, D_H-Gen-Segmente auf beiden Seiten von 12 Basenpaar Abstandhaltern. Die Katalyse der V(D)J-Rekombination erfolgt durch einen Enzymkomplex, der RAG1 und RAG2 (*engl.: recombination activating gene = RAG*) enthält. Die beiden Proteine RAG1 und RAG2 erkennen die 3'-RSS und 5'-RSS spezifisch, sie sind für die Umlagerung von DNA-Segmenten mit passenden RSS zuständig. Durch die Wechselwirkungen der RAG-Enzyme werden die DNA-Bereiche nebeneinander angeordnet, wobei Haarnadelstrukturen entstehen. Diese werden gespalten, wodurch DNA-Strangbrüche im Heptamer eingefügt werden, dabei entstehen einzelsträngige, palindromartige P-Nukleotide. Durch Endonuklease-Aktivität werden DNA-Abschnitte ganz oder teilweise entfernt. Die terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) fügt nach einem Zufallsprinzip Nukleotide hinzu, diese werden als N-Nukleotide bezeichnet. Die Einzelstrangbereiche in der Verknüpfungssequenz werden gepaart und von DNA-Reparaturenzymen wieder zu einem DNA Doppelstrang verbunden. Die zugefügten P- und N-Nukleotide, die die V-, D- und J-Gen-Segmente verbinden, sind nicht in der DNA Matrize codiert und bilden eine Verknüpfungssequenz, die zusätzliche Variabilität einfügt. Diese Umlagerung der V- und J-Segmente der leichten Kette erfolgt durch den gleichen Mechanismus. Die somatische Rekombination erhöht die Diversität

Einleitung

der B-Zell-Rezeptoren. Die Vielfalt der Kombinationsmöglichkeiten bei der V(D)J-Rekombination führt zu einer Einzigartigkeit jeder Vorläufer-B-Zelle., alle ihre Nachkommen prägen die gleiche V-Region aus (Janeway, 2002).

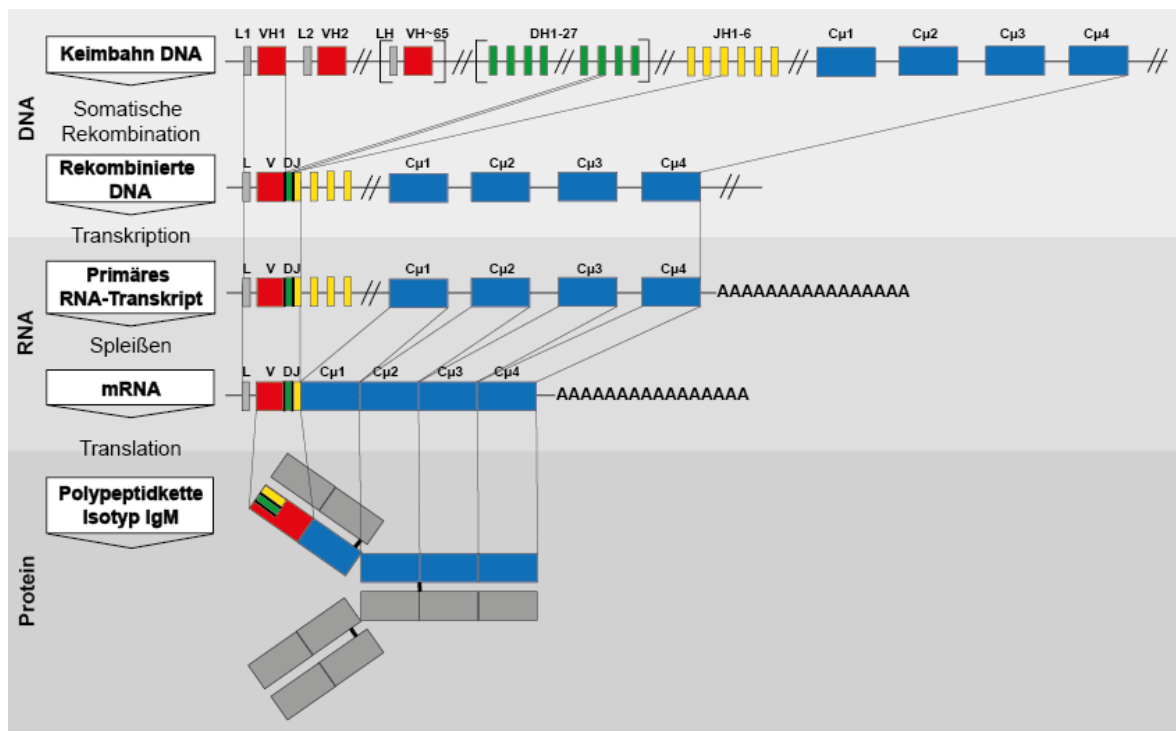


Abb.: 1.1 Expression des B-Zell-Rezeptors. Beginnend mit der somatische Rekombination der Schweren Kette in der Keimbahn. Dargestellt für den Isotyp IgM, Das primäre Transkript wird zur IgM mRNA gespleißt und dann in die schwere Kette des Antikörpers translatiert.

Da die Länge der Verknüpfungssequenz auf Zufall beruht, d.h. Nukleotide nicht in Triplets zugefügt werden, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass bei der V(D)J-Rekombination häufiger ein nicht funktionsfähiges, als ein funktionsfähiges Immunglobulin entsteht. Ein nicht funktionsfähiges Immunglobulin entsteht, wenn die Nukleotide der gesamten V-Region sich nicht durch 3 teilen lassen, es also zu einer Leserasterverschiebung in der Aminosäurekodierung kommt. Entsteht diese unproduktive Genuklagerung kann eine Umlagerung auf dem zweiten Allel des Schwereketten-Lokus stattfinden (Feddersen & Van Ness, 1985, Tiegs et al., 1993). Sollte die Rekombination auf dem zweiten Allel ebenfalls unproduktiv sein, geht die Zelle in Apoptose (Rajewsky, 1996). Entsteht jedoch bei der Umlagerungen des ersten Allels eine funktionsfähige schwere Kette, wird zum einen eine Umlagerung des zweiten Allels unterbunden (allelische Exklusion) und zum anderen die schwere Kette in Verbindung mit einem Leichtketten-Surrogat ausgeprägt, um die Funktionalität der schweren Kette zu testen. Bei mangelhafter Funktion bieten Genuklagerungen des zweiten Lokus eine Möglichkeit zur Ausbildung einer

funktionsfähigen schweren Kette (Zhang et al., 2003). Ist die schwere Kette funktionstüchtig, proliferiert die Prä-B-Zelle und beginnt die Rekombination der leichten Kette auf dem κ -Lokus. Sollte auf beiden κ -Genloci keine funktionelle Rekombination zustande kommen, werden diese Loci durch das κ -deletierende Element inaktiviert und es erfolgt eine Umlagerung der λ -Loci, wobei jede B-Zelle entweder eine κ -Leichtkette oder eine λ -Leichtkette ausprägt (Brauninger et al., 2001). Durch somatische Rekombination der schweren und leichten Ketten und deren möglichen Paarungen wird eine hohe Diversität generiert. Unreife B-Zellen mit funktionstüchtigem BCR werden auf Autoreaktivität getestet und gegebenenfalls eliminiert (Tiegs et al., 1993). Reife B-Lymphozyten verlassen das Knochenmark als antigenunerfahrene, naive B-Zellen, die auf ihrer Zelloberfläche zwei Isootypen IgM^+ und IgD^+ tragen, die beide durch alternatives Spleißen einer rekombinierten V-Region an entweder die C-Region von IgM oder von IgD entstehen.

1.3 Die Keimzentrumsreaktion

Naive B-Zellen zirkulieren in dem Blut- und Lymphsystem und den sekundären lymphatischen Organen. Nach Erkennung eines Antigens wird dieses spezifisch vom BCR gebunden und internalisiert. Die Antigenfragmente werden dann durch den MHCII-Komplex auf der Oberfläche der B-Zellen präsentiert und von Antigen-spezifischen T_H -Zellen erkannt (gekoppelte Erkennung), diese aktivieren wiederum die antigenpräsentierenden B-Zellen. Die so aktivierten B-Zellen werden antigenspezifisch in den T-Zell-Bereichen der Lymphknoten eingefangen und bilden einen primären Fokus an der Grenze von B-Zell-Follikel und der T-Zell-Zone, wo sie sich klonal vermehren. Nach einigen Tagen differenzieren einige der B-Zellen in antikörperbildende Plasmazellen aus, deren V-Gene normalerweise keine somatischen Mutationen tragen (Toellner et al., 2002). Die meisten B-Zellen migrieren zusammen mit den kognitiven T_H -Zellen in einen angrenzenden primären Lymphfollikel, wo sie schließlich ein Keimzentrum (*engl.: germinal center* = GC) bilden. Keimzentren sind die Hauptquelle von Gedächtnis-B-Zellen und langlebigen Plasmazellen als Produzenten hochaffiner Antikörper (Abbildung: 1.2). Keimzentren bestehen aus proliferierenden B-Zellen, die sich in einem Geflecht aus follikulären dendritischen Zellen (*engl.: follicular dendritic cell* = FDC) und kognitiven T_H -Zellen befinden, umgeben von einer Mantelzone aus ruhenden B-Zellen. Keimzentren lassen sich in zwei Bereiche unterteilen: die helle und die dunkle Zone. Die dunkle Zone besteht aus vorwiegend dicht gepackten, proliferierenden B-Zellen, den Zentroblasten.

Einleitung

Die helle Zone besteht vorwiegend aus T_H -Zellen, FDC und kleinen, sich nicht teilenden B-Zellen, den Zentrozyten (Kroese et al., 1990). Antigene, die mit T-Zell-Hilfe B-Zellen aktivieren und eine Keimzentrumreaktion auslösen, bezeichnet man als T-Zell-abhängige Antigene (TD-Antigene; *engl.: T cell dependent* = TD).

Zentroblasten unterlaufen Runden klonaler Expansion und somatischer Hypermutation, welche in umgeordnete V(D)J-Gene der schweren und leichten Kette Punktmutationen einführen, ein weiterer Schritt, der für die Diversität des BCR verantwortlich ist. Die hohe Proliferationsrate ist für die Generierung einer großen Anzahl modifizierter Immunglobuline in kurzer Zeit verantwortlich, von denen nur die B-Zellen mit hochaffinen BCR selektioniert werden (Jacob et al., 1991, Küppers et al., 1993). Für die somatische Hypermutation ist das Enzym AID (*activation-induced cytidine deaminase*) verantwortlich, das in den B-Zellen des Keimzentrums ausgeprägt wird. AID deaminiert in einzelsträngiger DNA von transkriptionsaktiven Genen Cytidin zu Uracil (Pham et al., 2003, Muramatsu et al., 2000). Die somatische Hypermutation durch AID findet bevorzugt an sogenannte Hotspotmotiven statt, die bevorzugt in den CDR-Regionen liegen (Jolly et al., 1996). Die Anzahl der Mutationen ist abhängig von der Transkriptionsstärke des Gens (Fukita et al., 1998). Bei somatischen Mutationen sind Transitionen, bei denen eine Purinbase durch eine Purinbase oder eine Pyrimidinbase durch eine Pyrimidinbase ersetzt wird, doppelt so häufig wie Tranversionen, bei der Purine durch Pyrimidine oder Pyrimidine durch Purine ersetzt werden (Rogozin & Diaz, 2004). Transitionen entstehen indem die RNA-Base Uracil nicht aus der DNA entfernt wird und die DNA-Polymerase den komplementären Strang synthetisiert. Für diesen Mechanismus gibt es zwei Modelle: die Basenaustausch-Reparatur, bei der die DNA-Glycosylase für die Erkennung und Entfernung des Uracils sorgt, und die DNA-Mismatch-Reparatur, durch die Fehlpaarungen korrigiert werden (Petersen-Mahrt et al., 2002). Somatische Mutationen durch AID entstehen mit einer Rate von 10^{-3} pro Basenpaar und pro Generation (Wagner & Neuberger, 1996). Sie finden sich ebenfalls in einigen Nicht-Ig-Genen, deren Mutationsfrequenz jedoch um das 50-100-fache geringer als bei V-Genen ist. Eines dieser Gene ist BCL6, das besonders in Zentroblasten ausgeprägt wird und ein Hauptregulator der Entwicklung von Keimzentrums-B-Zellen ist. Können somatische Mutationen im BCL6-Gen nachgewiesen werden, ist das ein Hinweis, dass die Zelle mindestens einmal an einer Keimzentrumreaktion teilgenommen hat, da BCL6 nur im Keimzentrum stark transkribiert wird, wo AID aktiv ist und somatische Mutationen in transkriptionsaktive Gene einbauen kann (Shen et al., 1998, Pasqualucci et al., 1998, Seifert & Küppers, 2009).

Die Mutationen sind auf eine 1-2 Kilobasen (kb) große Region 3' des V-Gen Promotors begrenzt. Die durchschnittliche Verteilung der somatischen Mutationen beginnt 150 Basenpaare (bp) nach dem Transkriptionsstart und nimmt innerhalb des Bereiches von 1-

2 kb der V-Region exponentiell ab (Rada & Milstein, 2001). Da die C-Region durch ein großes Intron (4-6 kb) von der V-Region getrennt ist, ist die C-Region nicht von Mutationen betroffen. Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch in der Gerüstregion (FR) führen, verändern häufig die grundlegende Antikörperstruktur. Verhindern Mutationen eine Funktionalität des BCR unterliegt die B-Zelle negativer Selektion und unterläuft Apoptose. Stille Mutationen, welche die Aminosäuresequenz nicht verändern, verteilen sich gleichmäßig über die gesamte V-Region. Bindet ein BCR, nach Einführung somatischer Mutationen, besser an kognitives Antigen, beruht dies meist auf Aminosäureaustausch-Mutationen in den CDR-Regionen. Diese B-Zellen werden positiv selektiert, oftmals in iterativen Zyklen von Proliferation, Mutation und Selektion über Generationen hinweg. Dieser Prozess wird als Affinitätsreifung bezeichnet (Rajewsky, 1996, Küppers et al., 1993). Zentrozyten benötigen für die Selektion ein Überlebenssignal von T-Zellen. Das wird vermittelt durch die auf MHCII präsentierten Antigene, die Länge und Intensität der Interaktion von B- und T-Zelle, unter anderem durch CD40/CD40-Ligand (CD40L oder CD154), und von T-Zellen produzierte Zytokine (Toellner et al., 2002). B-Zellen, die ausreichend hohe Affinität für ein Antigen erreichen und positiv selektiert werden, erhalten Überlebenssignale.

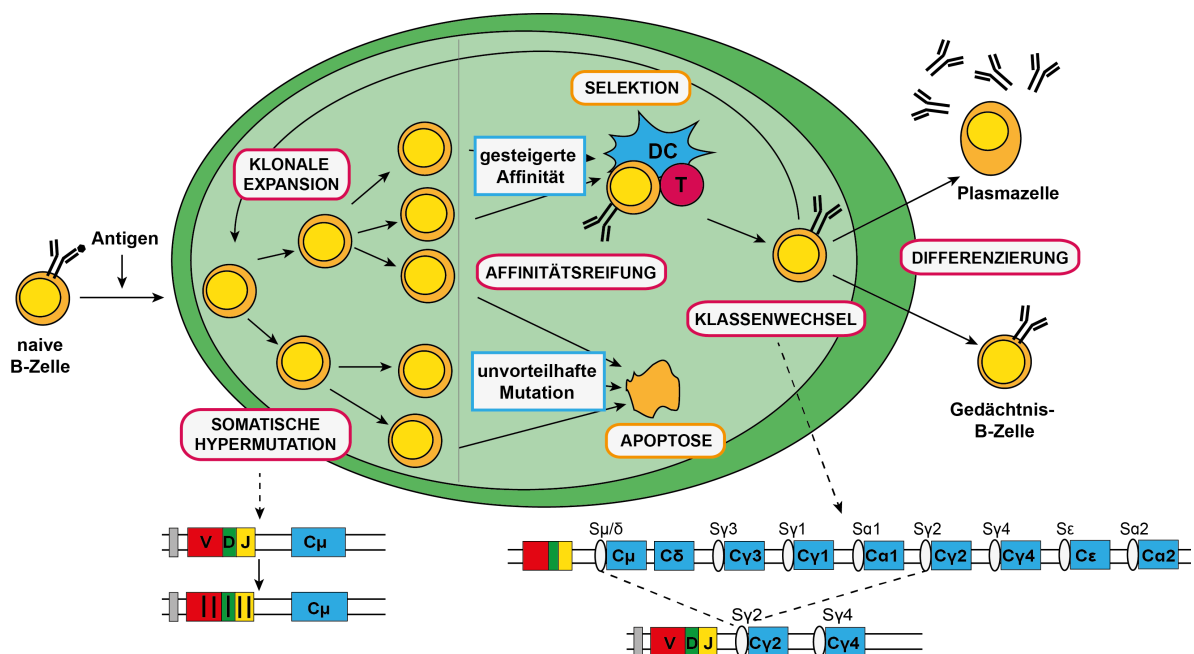


Abb.: 1.2 Keimzentrumsreaktion. Entstehungsweg von Plasma- und Gedächtnis-B-Zellen aus naiven B-Zellen. Dargestellt sind die beiden Zonen des Keimzentrums: in der dunklen Zone findet die somatische Hypermutation statt, in der hellen Zone Affinitätsreifung und Klassenwechsel.

Einleitung

In den Zentrozyten kann es auch zu einem Wechsel des Isotyps von IgM und IgD zu IgG, IgA oder IgE kommen. Dies erfolgt nicht zufällig sondern durch externe Signale z.B. Zytokine oder auch Pathogenstrukturen sowie T-Zellen. Es gibt fünf Hauptisotypen der Immunglobuline: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. IgG lässt sich weiter in vier und IgA weiter in zwei Unterklassen unterteilen. Die Isotypen unterscheiden sich sowohl in der Sequenz als auch im Aufbau der schweren Kette. Die C_H-Regionen, welche den Isotyp des Antikörpers und damit seine Effektorfunktion festlegen, werden von Genen kodiert, die stromabwärts der V-Gene des Locus der schweren Kette liegen. Der Klassenwechsel ist ein IgH Locus spezifisches, irreversibles, somatisches Deletions- und nicht-homologes Rekombinationsereignis zwischen zwei Erkennungssequenzen für den Klassenwechsel, den Schaltregionen (*engl.: switch* = S). S-Regionen sind repetitive, Guanin-reiche Sequenzen, die sich am 5'-Ende einer jeden C_H-Region außer der C_δ-Region befinden (Kataoka et al., 1981). Die Isotypen IgM und IgD werden durch alternatives Spleißen eines mRNA-Transkripts gewonnen (Preud'homme et al., 2000). Für den sogenannten Klassenwechsel von Immunglobulinen ist ebenfalls AID wichtig (Muramatsu et al., 2000). Die DNA-Rekombination beginnt bei der S_μ-Region, diese kann sich an jede andere S-Region stromabwärts von IgM anlagern. AID führt Doppelstrangbrüche in den *switch*-Regionen 5' der C_H-Region ein und knüpft unter Deletion eines oder mehrerer C_H-Regionen ein weiter 3' gelegenes C-Gensegment an den V_HD_HJ_H-Lokus. Soll ein Klassenwechsel nach IgG3 stattfinden, so lagert sich die S_μ-Region an die S_{γ3}-Region an, dabei bildet die DNA zwischen den beiden S-Regionen eine Schlaufe, die ausgeschnitten wird. Eine zirkuläre DNA mit den C-Regionen von IgM und IgD entsteht (Iwasato et al., 1990, Wuerffel et al., 1997). In der C-Region der verschiedenen Isotypen befindet sich eine Domäne, die von spezialisierten Fc-Rezeptoren erkannt werden kann. So z.B. kann der jeweilige Antikörper in Bereiche des Körpers geschleust werden, zu denen nur dieser Isotyp Zugang hat. Dies erfolgt durch aktiven Transport. Eine weitere Effektorfunktion ist die Aktivierung des Komplementsystems. Nicht alle Isotypen oder Unterklassen der Immunglobuline verfügen über die gleichen Fähigkeiten, jede der möglichen Effektorfunktionen auszulösen (Manis et al., 2002).

Am Ende dieses Prozesses können sich Zentrozyten in drei Zelltypen differenzieren: sie können zu Zentroblasten werden und in die dunkle Zone wandern und weitere Runden somatischer Mutationen durchlaufen, oder sie verlassen das Keimzentrum und werden zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen (Klein & Dalla-Favera, 2008, Küppers et al., 1993).

1.4 T-Zell-unabhängige Immunantworten

Antigene, die ohne T-Zell-Hilfe B-Zellen stimulieren und die Bildung von Antikörpern auslösen können, werden als T-Zell-unabhängige Antigene (TI-Antigene; *engl.: T cell independent* = TI) bezeichnet. Diese Antigene sind z.B. bakterielle Polysaccharide, und Lipopolysaccharide. Sie lösen eine Immunantwort ohne Keimzentrumsreaktion aus bei der Plasmazellen gebildet werden, deren Antikörper jedoch nicht somatisch mutiert und durchschnittlich niedriger affin sind. Aufgrund ihrer Aktivierungsweise können die TI-Antigene in zwei Gruppen unterteilt werden (Janeway, 2002). TI-1-Antigene werden auch als B-Zell-Mitogene bezeichnet, da sie direkt die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen auslösen. In hoher Konzentration geschieht dies unabhängig von der Antigenpezifität und wird als polyklonale Aktivierung bezeichnet. Bei niedrigeren Konzentrationen werden nur die B-Zellen aktiviert die spezifisch an das TI-1-Molekül binden (Janeway, 2002). TI-2-Antigene sind Moleküle wie zum Beispiel bakterielle Zellwandpolysaccharide, die hochrepetitive Strukturen aufweisen. Diese Antigene können die BCRs der antigenspezifischen B-Zellen kreuzvernetzen, so dass die Bakterien phagozytiert werden können. Bei diesen Antigenen ist eine Beteiligung von T-Zellen, etwa durch Zytokine wahrscheinlich. Es findet jedoch keine Affinitätsreifung des BCR statt (Mond et al., 1995, Janeway, 2002, Toellner et al., 2002). Als Reaktion auf TI-2-Antigene werden sowohl IgM- als auch IgG-Antikörper gebildet. Immunreaktionen gegen TI-2-Antigene sind auf eine Spezifität des BCR angewiesen und sind daher adaptive Immunantworten (Janeway, 2002). Die zentralen Eigenschaften adaptiver Immunantworten sind Spezifität und Gedächtnis. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit TI-Antigenen immunisiert wurden, bei erneuter Immunisierung eine verbesserte, sekundäre Immunreaktion aufwiesen. Die Keimzentrumsreaktionen kollabieren jedoch bevor eine Trennung in die dunkle und die helle Zone stattfinden kann, da für die Selektion der Zentrozyten T-Zell-Hilfe nötig ist (Toyama et al., 2002, Toellner et al., 2002). Die beteiligten B-Lymphozyten sind jedoch nur wenig bzw. unmutiert und nicht langlebig, was auch durch Arbeiten an *Bcl6*-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte. Deren Gedächtnis-B-Zellen werden unabhängig von Keimzentrumsreaktionen generiert und sind klassengewechselt (IgG), jedoch nicht somatisch mutiert und langlebig. Bei einer sekundären Immunantwort können die keimzentrumsunabhängigen B-Zellen auch ihre Ig-Gene mutieren (Kaji et al., 2012, Kaji et al., 2013).

1.5 Gedächtnis-B-Zellen

Klassische Gedächtnis-B-Zellen im Menschen sind IgM und IgD negativ, sie werden also als klassengewechselt (IgG, IgA oder IgE) bezeichnet (Black et al., 1978). Des Weiteren sind sie keimzentrumserfahren, da ihre Ig-Gene somatische Mutationen tragen (Weiss & Rajewsky, 1990). Die Post-GC-B-Zellen, die das Keimzentrum verlassen, werden als CD27 positiv angesehen und sind entweder Antikörper sezernierende Plasmazellen ($CD27^{high}$) oder Gedächtnis-B-Zellen ($CD27^+$); im Gegensatz zu naiven B-Zellen, die als CD27 negativ definiert wurden (Maurer et al., 1992, Agematsu et al., 1997, Klein et al., 1998b). CD27 ist ein Typ I transmembranes Glycoprotein und Mitglied der TNF-Rezeptor Familie (Tumornekrosefaktor = TNF). Es interagiert mit CD70, das auf aktivierten CD45RO (Gedächtnis) T-Zellen ausgeprägt wird (Agematsu et al., 1995). Die intrazelluläre Signaltransduktion von CD27 erfolgt über das Signalmolekül *Traf*, das mit Überleben, Differenzierung und Migration in Verbindung steht (Aggarwal, 2003). Neben den klassischen Gedächtnis-B-Zellen ist bei einigen B-Zellpopulationen die Zugehörigkeit zu den Gedächtnis-B-Zellen noch nicht final geklärt, entweder aufgrund ihres Isotyps ($IgM^+IgD^+CD27^+$) oder aufgrund ihrer nicht vorhandenen CD27 Expression (IgG^+CD27^- und IgA^+CD27^-).

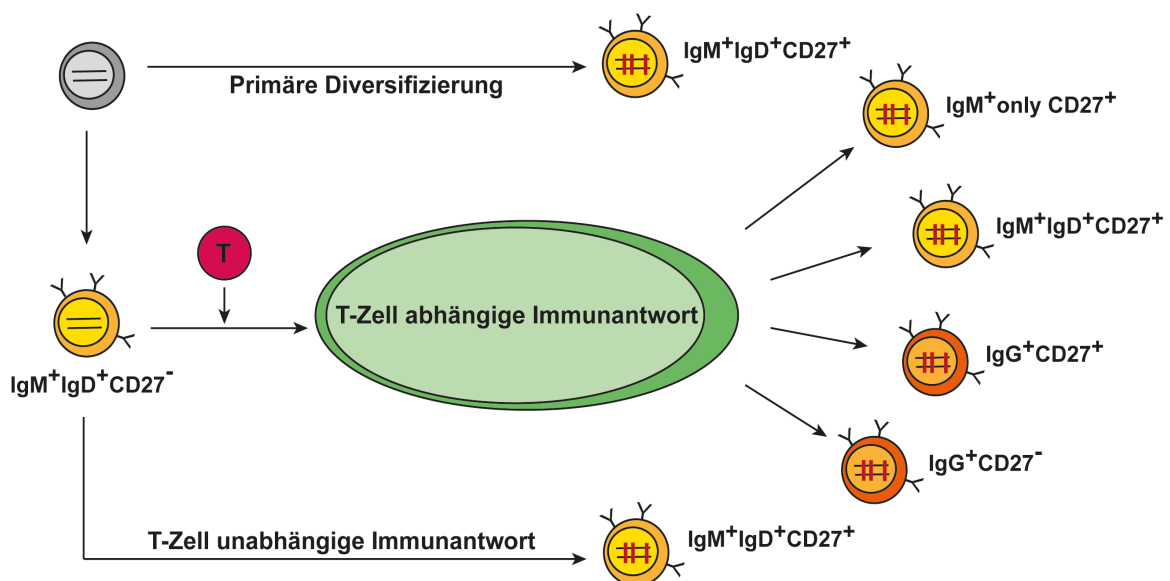


Abb.: 1.3 Gedächtnis-B-Zellpopulationen. Putative Generierungswege der $IgM^+IgD^+CD27^+$ Gedächtnis-B-Zellen.

Eine dieser Populationen, IgG^+CD27^- , repräsentiert ca. 15-25% der IgG positiven B-Zellen im menschlichen Blut. Diese werden aufgrund ihrer mutierten Ig-Gene, ihrer Morphologie und ihres Phänotyps als Gedächtnis-B-Zellen angesehen (Fecteau et al., 2006). Durch Unterschiede in der Verwendung der IgG-Unterklassen und in der durchschnittlichen Mutationsfrequenz zu klassischen Gedächtnis-B-Zellen werden sie als miteinander

verwandt angesehen und können von der gleichen Keimzentrumsreaktion stammen. Somit wird die Frage aufgeworfen, ob CD27 als Oberflächenmarker aller Gedächtnis-B-Zell-Subpopulationen fungiert (Wu et al., 2011, Fecteau et al., 2006).

Eine andere B-Zell-Population, bei der die Zugehörigkeit zur Gedächtnis-B-Zellen diskutiert wird, sind $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen. Bei diesen gibt es verschiedene Theorien über ihre Entstehung und welcher B-Zell-Population diese zuzuordnen sind (Abbildung: 1.3). Die Ig-Gene der $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen sind somatisch mutiert, allerdings mit einer niedrigeren durchschnittlichen Mutationsfrequenz als klassische Gedächtnis-B-Zellen (Klein et al., 1997, Klein et al., 1998b).

In Patienten mit Hyper-IgM-Syndrom ist die CD40-CD154-Interaktion defekt. Diese Patienten haben eine Beeinträchtigung bei der Keimzentrumsreaktion und dem Klassenwechsel, da für beide Prozesse T-Zell Hilfe durch CD154 (CD40L) unentbehrlich bzw. hilfreich ist. Zwar finden sich in diesen Patienten mutierte $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen, jedoch weniger als in gesunden Menschen und keine $\text{IgM}^+\text{IgD}^-\text{CD27}^+$ B-Zellen (IgM-only) oder klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen (Weller et al., 2001). Das führte zu der Vermutung, dass die $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen ihre V-Gene ähnlich denen in Schafen und Hasen bereits in der primären Diversifizierung mutieren. Folglich wären diese keine Gedächtnis-B-Zellen (Weill et al., 2004).

Interessanterweise sind gerade diese $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen sowohl im Blut als auch in der Milz wichtig bei Immunantworten gegen TI-Antigene z.B. bei einer Vakzinierung gegen nicht-Konjugierte Pneumokokken (Weill et al., 2004). Die Marginalzone (*engl. marginal zone*) der Milz ist eine wichtige histologische Struktur für die Vermittlung von Immunität gegen TI-Antigene, die Marginalzone besteht hauptsächlich aus IgM^+ B-Zellen. Die Vermutung ist, dass diese $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen das zirkulierende Äquivalent der Milz Marginalzonen-B-Zellen darstellen. Kinder unter zwei Jahren haben keine Marginalzone ausgebildet und nur niedrig bis unmutierte $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen (Weller et al., 2008). Nach dem Verlust der Milz besitzen asplenische Menschen kaum noch mutierte $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen und haben eine schlechte Immunantwort gegen Polysaccharid-Antigene (Weller et al., 2004, Weller et al., 2005, Kruetzmann et al., 2003).

Die Marginalzone dient aber auch der Immunantwort gegen zirkulierende TD-Antigene (Song & Cerny, 2003). Diese Marginalzonen-B-Zellen werden aufgrund ihrer somatisch mutierten V-Gene als TD-generiert betrachtet und somit als Gedächtnis-B-Zellen angesehen (Dunn-Walters et al., 1995). Bei peripheren Blut B-Zellen wurden auch klonal verwandte Sequenzen mit IgG- und IgM-Isotyp gefunden, die V_H -Gene der IgM^+ B-Zellen waren jedoch niedriger mutiert als die der IgG^+ B-Zellen. Das ließ darauf schließen, dass die IgM^+ B-Zellen früher das Keimzentrum verlassen. Als weiteres Indiz für diese Theorie

wurde das für die Keimzentrumsreaktion notwendige Gen *Bcl6* angesehen. Gedächtnis-B-Zellen weisen auch im *Bcl6* Mutationen auf, jedoch deutlich weniger als in den V-Genen. Es konnte in den $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen Mutationen im *Bcl6* gefunden werden, was ein Beweis dafür ist, dass diese Zellen einmal an einer Keimzentrumsreaktion teilgenommen haben, da AID im Keimzentrum nicht nur somatische Mutationen in die V-Gene einbaut sondern auch in andere transkriptionsaktive Gene (Seifert & Küppers, 2009).

1.6 Zielsetzung

Sowohl die Herkunft als auch die spezifische Funktion von $\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen ist nicht hinreichend geklärt und wird kontrovers diskutiert. Aber auch Herkunft und Funktion der $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen ist noch endgültig zu klären. In früheren Studien (Seifert & Küppers, 2009), dass ein Großteil der $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen keimzentrumserfahren sind, da sie Mutationen im *BCL6*-Gen tragen und häufig eine klonale Verwandtschaft zwischen $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen besteht. In dieser Arbeit wurden die V-Gene mittels PCR, Klonierung und anschließender Sanger-Sequenzierung untersucht. Dieses zeitaufwändige Verfahren ist unzureichend, um eine große Anzahl an IGHV-Genen zu sequenzieren und so Größe und Diversität von Gedächtnis-B-Zell-Populationen quantitativ zu untersuchen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels einer Massiv-parallelen-Sequenzierung der V_H -Gene die klonale Zusammensetzung, Komplexität und Verwandtschaft der vier Hauptpopulationen von Gedächtnis-B-Zellen aufzuklären. Die Auswertung der Daten orientiert sich an folgenden Zielen: 1. Die Größe, Diversität und Komplexität von $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$, $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$, $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgM}^+\text{onlyCD27}^+$ B-Zell-Populationen soll bestimmt werden. 2. Die klonale Zusammensetzung, d.h. intraklonale Diversität, IgG-Unterklassenverwendung und die Häufigkeit gemischter, d.h. IgM^+ und IgG^+ B-Zellen aufweisender Klone soll gemessen werden. 3. Anhand von Mutationsbaumanalysen sollen Rückschlüsse auf die Dynamik und mögliche Entstehungsszenarios von Gedächtnis-B-Zelleklonen in Keimzentrumsreaktionen mit spezifischen oder gemischten Subpopulationen gezogen werden. Abgesehen von einem grundlegenden Interesse, die Herkunft und Funktion aller humanen Gedächtnis-B-Zellen aufzuklären, erlangt man durch diese Studien ein besseres Verständnis der spezifischen Antikörperreaktion gegen Pathogene und es werden wertvolle Erkenntnisse über die Zusammensetzung von Antikörperspezifitäten in einem Individuum und die Dynamik der Gedächtnisfunktion von B-Lymphozyten gewonnen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklav: Varioklav	Thermo Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Zellsortierer: Aria I	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Durchflußzytometer: Canto I	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Einstellbare Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einstellbare Pipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Eismaschine: AF100	Scotsmann, Vernon Hills, Vereinigte Staaten
Heizblock: Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizblock: Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus	Pipettierhilfe: Hirschmann, Neckartenzlingen, Deutschland
Thermocycler: T1	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler: T-Professional	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler: UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge: CT15E Himac	Hitachi, Chiyoda, Japan
Zentrifuge: Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten
Zentrifuge: Heraeus Multifuge X1R	Thermo Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (blau, gelb, weiß)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Plastikpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischale (9 cm Durchmesser)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml), dünnwandig	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (blucaps 15 ml / 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Matherial und Methoden

2.1.3 Nährmedien, Puffer und Lösungen

Ampicillin (100 mg/ml):

100 mg Ampicillin-Pulver
1 ml 70% Ethanol

Agarose-Platten:

25 g LB-Pulvermedium (*engl.: lysogeny broth = LB*)
15 g Agarose
1 l dH₂O

Das Medium wird autoklaviert, in einem Wasserbad bis auf 50°C abgekühlt, für die Antibiotikaselektion mit 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) versetzt, in Petrischalen mit 9 cm Durchmesser gegeben (20 ml pro Schale) und nach dem Aushärten bei 4°C gelagert.

LB-Medium:

25 g LB-Pulvermedium
1 l dH₂O

Das Medium wird nach dem Lösen autoklaviert und bei 4°C gelagert.

PBS (*engl.: phosphate buffered saline*):

50 ml 10X PBS (Pan-Biotech, Aidenbach, Germany)
auf 500 ml mit dH₂O auffüllen

Lösung autoklavieren.

PBS/BSA 0,5%

2,5 g BSA (*engl.: bovine serum albumin*)
500 ml PBS

50 x TBE (Tris-Borat-Elektrophorese-Puffer):

242 g Trisbase
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA
auf 1 l dH₂O auffüllen

Lösung autoklavieren.

2.1.4 Oligonukleotide

RT-PCR Oligonukleotide:

Oligonukleotid für Reverse Transkription: Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland

Oligonukleotidname	Sequenz (5'→3')
IgM-RT-PCR	CCACGCTGCTCGTAT
IgG-RT-PCR	TAGTCCTTGACCAGG
Anlagerungstemperatur: 42° C Orientierung: Strang aufwärts	

5 µl einer 100 µM Verdünnung von IgM-RT-PCR versetzt mit 45 µl 10 mM Tris-Puffer

5 µl einer 100 µM Verdünnung von IgG-RT-PCR versetzt mit 45 µl 10 mM Tris-Puffer

V-Gen PCR Oligonukleotide:

V_HL-Oligonukleotid-Mischung: Eurofins MWG Operon

Oligonukleotidname	Sequenz (5'→3')
VH1L	CTCACCATGGACTGGACCTGGAG
VH3L.1	ACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTG
VH3L.2	ACCATGGAACTGGGGCTCCGCTG
VH4L	AAGAACATGAAACACCTGTGGTTCTTC
Anlagerungstemperatur: 60° C Orientierung: Strang abwärts	

je 5 µl einer 100 µM Verdünnung von: V_H1L; V_H3L.1; V_H3L.2; V_H4L gemischt mit 30 µl 10 mM Tris-Puffer (10 µM Endkonzentration)

Constant-Oligonukleotide: Eurofins MWG Operon

Oligonukleotidname	Sequenz (5'→3')
C _μ	GCTCGTATCCGACGGGGAATTCTCAC
C _γ	GCAGCCCAGGGCSGCTGTGC
Anlagerungstemperatur: 60° C Orientierung: Strang aufwärts	

5 µl einer 100 µM C_μ-Verdünnung versetzt mit 45 µl 10 mM Tris-Puffer (10 µM Endkonzentration)

5 µl einer 100 µM C_γ-Verdünnung versetzt mit 45 µl 10 mM Tris-Puffer (10 µM Endkonzentration)

Matherial und Methoden

Oligonukleotide für Sanger-Sequenzierung von DNA-Fragmenten im pGEM-T easy:

Oligonukleotidname	Sequenz (5'→3')
M13	GTTTCCAGTCACGAC
Anlagerungstemperatur: 50°C	
Orientierung: Strang abwärts	

Amolicon Library Oligonukleotide:

Barcode-Oligonukleotide: Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland

Oligonukleotidname	Sequenz (5'→3')
IgMlgD/CD27_A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>ACATGC</u> GCTCGTATCCGACGGGGAATTCTCAC
IgMlgD/CD27_B	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>ACTATC</u> GCTCGTATCCGACGGGGAATTCTCAC
IgMlgD/CD27_C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>ACAGTC</u> GCTCGTATCCGACGGGGAATTCTCAC
IgMlgD/CD27_D	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>ACGTAC</u> GCTCGTATCCGACGGGGAATTCTCAC
IgMonly/CD27_A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>ATATAC</u> GCTCGTATCCGACGGGGAATTCTCAC
IgMonly/CD27_B	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>ATCTAG</u> GCTCGTATCCGACGGGGAATTCTCAC
IgMonly/CD27_C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>ATACTC</u> GCTCGTATCCGACGGGGAATTCTCAC
IgMonly/CD27_D	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>ATGATG</u> GCTCGTATCCGACGGGGAATTCTCAC
IgG/CD27_A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>TATGTC</u> GCAGCCCAGGGC S GCTGTGC
IgG/CD27_B	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>TACTAG</u> GCAGCCCAGGGC S GCTGTGC
IgG/CD27_C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>TAGATC</u> GCAGCCCAGGGC S GCTGTGC
IgG/CD27_D	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>TATCAG</u> GCAGCCCAGGGC S GCTGTGC
IgG_A	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>TCTAGC</u> GCAGCCCAGGGC S GCTGTGC
IgG_B	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>TCACAG</u> GCAGCCCAGGGC S GCTGTGC
IgG_C	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>TGAGTC</u> GCAGCCCAGGGC S GCTGTGC
IgG_D	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>TGTCTC</u> GCAGCCCAGGGC S GCTGTGC
Anlagerungstemperatur: 60° C	
Orientierung: Strang abwärts	

Sequenzcode: VHL-Oligonukleotide; **Primer-B-Key**; Barcode

Je 5 µl einer 100 µM Verdünnung versetzt mit je 45 µl 10 mM Tris-Puffer (10 µM Endkonzentration)

V_HL-Oligonukleotid-Mischung: Metabion

Oligonukleotidname	Sequenz (5'→3')
VH1L	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG CTCACCATGGACTGGACCTGGAG
VH3L.1	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG ACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTG
VH3L.2	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG ACCATGGAAGTGGGGCTCCGCTG
VH4L	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG AAGAACATGAAACACCTGTGTTCTTC
Anlagerungstemperatur: 60° C Orientierung: Strang abwärts	

Sequenzcode: VHL-Oligonukleotide; **Primer-B-Key**

je 5 μ l einer 100 μ M Verdünnung von: V_H1L; V_H3L.1; V_H3L.2; V_H4L gemischt mit 30 μ l 10 mM Tris-Puffer (10 μ M Endkonzentration)

2.1.5 Antikörper

Anti-human CD27-APC	Becton Dickinson
Anti-human IgD-PECy7	Becton Dickinson
Anti-human CD23-PE	Becton Dickinson
Anti-human IgM-FITC	Becton Dickinson
Anti-human IgG-FITC	Becton Dickinson
Anti-CD19 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

2.1.6 Computersoftware und Internetadressen

Adobe Illustrator CS6

EnzymeX (Mekentosj)

FlowJo 887 (Tree Star)

Graphviz

Inkscape

Lasergene 8 (DNASTAR)

Microsoft Office

4Peaks (Mekentosj)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung humaner Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Die Isolierung humaner B-Zellen erfolgt aus 500 ml Vollblut. Die Entnahme geschieht unter Einwilligung der lokalen Ethikkommission und nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Spender. Die Blutentnahme erfolgt in einen Infusionsbeutel, in dem 5000 Einheiten Heparin (Heparin-Natrium-5000 von Ratiopharm, Ulm, Deutschland) enthalten sind.

2.2.1.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein physikalisches Trennverfahren von Partikeln anhand ihrer Sedimentation in einem Dichtegradienten. Die Zellen werden anhand ihrer Bewegungsgeschwindigkeit (Sedimentationsgeschwindigkeit), die abhängig von der Größe ist, aufgetrennt.

Um Lymphozyten aus dem Blut mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zu isolieren werden 15 ml Pancoll-Lösung (Pancoll human von Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland) in Leucosep™-Röhrchen (Greiner bio-one, Kremsmünster, Deutschland) gefüllt und kurz bei 1000 x g zentrifugiert, damit die Lösung unter die Membran gelangt. Die überschüssige Lösung wird abgeschüttet. Anschließend wird das Vollblut auf die Membran geschichtet und für 40 Min. bei 400 x g ohne Bremse zentrifugiert. Dabei reichern sich Zellen ähnlicher Masse in einer Schicht an, die dann mit einer Pipette abgenommen werden kann. Die Zellen werden in PBS-Puffer bei 400 x g 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen mit 10-fachem Volumen Puffer gewaschen (Zentrifugation: 5 Min., 400 x g) und in Puffer resuspendiert.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die Anzahl der Zellen zu ermitteln, müssen die Zellen in Medium gelöst sein. Die Zellen werden 1:10 mit Trypanblau (Sigma) verdünnt, 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Es werden die vier großen Eckquadrate gezählt und der Wert durch 4 geteilt um den Mittelwert zu erhalten. Aus diesem Mittelwert wird wie folgt die Zellzahl pro ml gerechnet: $\text{Zellzahl} \times 10^4 \times 10$

2.2.1.3 MACS

Zur Aufreinigung von B-Zellen wird der Pan-B-Zell-Marker CD19 für magnetische Zellseparation (*engl.: magnetic associated cell sorting* = MACS) genutzt. MACS ist eine Methode bei der Zellen von einem Gemisch aufgrund von Oberflächenmerkmalen abgetrennt werden. Die Zellen werden mit Antikörpern, die an kleine Magnetpartikel gebunden sind, inkubiert. Die Antikörper binden spezifisch an die Oberflächemoleküle der Zellen und somit wird die gewünschte Zellpopulation mit Magnetpartikel markiert. Die Säule ist von einem starken Magnetfeld umgeben. Beim Durchfluss des Zellgemisches durch die Säule werden die mit den Magnetpartikel markierten Zellen zurückgehalten. Auf diese Weise erhält man beim Spülen der Säule unmarkierte Zellen. Nach dem Entfernen des Magnetfeldes kann zudem auch die markierte Zellpopulation durch Spülen der Säule gewonnen werden und steht damit ebenfalls für weitere Versuche zur Verfügung. Hierzu werden die Lymphozyten in Puffer (PBS/BSA 0,5%) resuspendiert und 15 Min. mit 1/10 Volumen anti-CD19-Microbeads inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 10-fachem Volumen Puffer gewaschen (Zentrifugation: 5 Min., 400 x g) und die B-Zellen über eine LS-MACS-Säule (Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben angereichert.

2.2.1.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*engl.: fluorescence activated cell sorting* = FACS) ist eine Methode zur Analyse von Zellen nach Färbung mit fluoreszenten Farbstoffen (Fluorochromen). Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von Licht durch fluorochrommarkierte Zellen. Dabei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine sehr dünne Kapillare gezogen. Diese passieren dann im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen streuen das Licht, welches mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen wird. Das Vorwärtsstreulicht (*engl.: forward scatter* = FSC) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (*engl.: side scatter* = SSC) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, welches von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns sowie der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Gleichzeitig werden die Fluorochrome durch Laser angeregt. Die Wellenlänge, die ein Laser erzeugt und mit der ein Fluorochrom aktiviert wird, ist abhängig von Fluorochromtyp. Trifft ein Laserstrahl definierter Wellenlänge auf ein Fluorochrom, so emittiert das Fluorochrom das Licht aber mit einer höheren Wellenlänge. Diese Wellenlänge ist dann durch die Detektoren messbar.

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACSsort) ist ein spezieller Typ der Durchflusszytometrie. Fluoreszenzmarkierte Zellen können nach bestimmten

Matherial und Methoden

Merkmale sortiert werden. Dazu durchlaufen die Zellen in Tropfen den Laserstrahl und es wird ihre Größe, Granularität und Fluoreszenz gemessen. Anschließend werden sie aufgrund ihrer ausgewählten Merkmale in einem separaten Gefäß aufgefangen.

Die B-Zell-Suspension (200 µl) wird halbiert und einmal mit anti-CD27-APC (1:5), anti-IgD-PECy7 (1:10), anti-CD23-PE (1:4) und anti-IgM-FITC (1:5) Antikörpern und zum anderen mit anti-CD27-APC (1:5), anti-IgD-PE (1:5) und anti-IgG-FITC (1:5) Antikörpern jeweils für 15 Min. inkubiert. Die Antikörper werden zusammen jeweils in einem Reaktionsgefäß inkubiert und mit 2 ml PBS/BSA 0,5% gewaschen. Daraus werden die einzelnen B-Zell-Populationen mit Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung mit dem Aria I (Becton Dickinson) aufgereinigt. Von folgenden Gedächtnis-B-Zell-Populationen werden jeweils zwei Replikate pro Population in 200 µl Trizol sortiert: 50.000 Zellen IgMIgD (IgM⁺IgD⁺CD27⁺CD23^{low/-}), 5.500 Zellen IgM-only (IgM⁺IgD⁻CD27⁺CD23^{low/-}), und zwei klassengewechselte IgG-positive B-Zelle-Populationen: 45.000 Zellen /46.000 Zellen CD27-positive (IgD⁻IgG⁺CD27⁺) und 8.000 Zellen / 10.000 Zellen CD27-negative (IgD⁻IgG⁺CD27⁻).

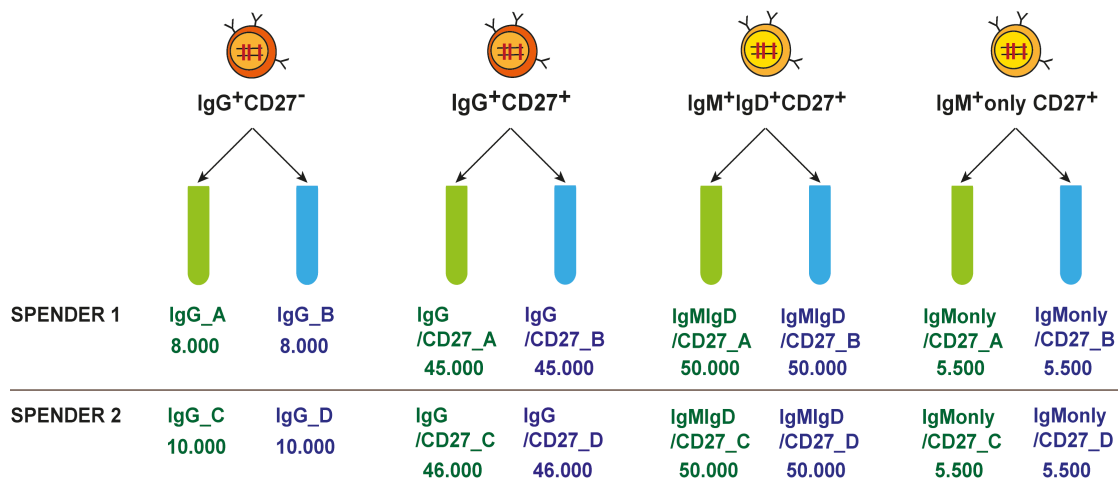


Abb.: 2.1 Sortierschema: aus 500 ml Vollblut wurden für Spender 1 217.000 Zellen und für Spender 2 223.000 Zellen sortiert. Die Zellzahl pro Population wurde an das Verhältnis im peripheren Blut angepasst. Pro Population wurden zwei Replikate sortiert. Spender 1: Probe A / B; Spender 2: Probe C / D.

Die Reinheit der Sortierungen wird mittels Durchflußzytometrie kontrolliert und beträgt >98%. Alle oben genannten Arbeitsschritte erfolgen auf Eis, alle Zentrifugierungen und die Zellsortierung geschehen unter Kühlung (4°C).

2.2.2 RNA Isolierung

Zu den in 200 µl Trizol gelösten Zellen werden 40 µl Chloroform gegeben, gut gemischt bis die Suspension milchig rosa ist; anschließend für die Phasentrennung bei 10.000 x g, für 15 Min. bei 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgenommen und mit gleichem Volumenanteil 70% Ethanol gut gemischt und die Aufreinigung mit dem RNeasy micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wird die Ethanol-Phase Mischung auf ein MiniElut Spin Columns geben und bei 10.000 x g, 1 Min. zentrifugieren. Die Säule wird erst mit 350 µl RW1 Puffer und dann mit 700 µl RPE Puffer waschen. Anschließend wird die Säule bei 10.000 x g, 4 Min. zentrifugiert und mit 14 µl RNase-freiem Wasser für 10 Min. inkubiert und dann eluiert. Die RNA-Qualität wird mittels RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Santa Clara, Vereinigte Staaten) und die RNA-Menge mit dem Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, Vereinigte Staaten) bestimmt.

2.2.3 cDNA Synthese

Eine Isotyp-spezifische Reverse Transkription wurde mit Sensiscript RT Kit (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurden IgM- bzw. IgG-spezifische Oligonukleotide anstelle von Random Hexamer oder Oligo(dt) Oligonukleotiden verwendet, ansonsten wurde das Sensiscript Protokoll eingehalten.

Ansatz:	9 µl RNA
	2 µl dNTP (2,5 mM)
	2 µl 10x RT-Puffer
	2 µl 10 µM Oligonukleotid: IgM-RT-PCR / IgG-RT-PCR
	je nach Zellpopulationen
	3 µl dH ₂ O
Polymerasen:	1 µl RNase Inhibitor (10 U/µl)
	1 µl Sensiscript
Programm:	42°C, 60 Min.

2.2.4 V-Gen-PCR

Die Standardmethode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen ist die Polymerase-Kettenreaktion (*engl.: polymerase chain reaction* = PCR). cDNA, die aus RNA mittels Reverser Transkription gewonnen wird, dient als Matrize (*engl.: template*). Als DNA-Polymerase wird die PhusionTM High-Fidelity (Finnzymes, Thermo Scientific) verwendet. Diese DNA-Polymerase hat eine sehr niedrige Fehlerrate von $4,4 \times 10^{-7}$. Das ist entscheidend, da in der vorliegenden Arbeit V_H-Gene analysiert werden. Da V_H-Gene somatische Mutationen tragen und Substitutionen von Basen während der PCR für somatischen Mutationen gehalten werden können, da sie sich ebenfalls zur Keimbahnreferenz unterscheiden, sollten Mutationen durch DNA-Polymerasen bei der PCR so gering wie möglich gehalten werden. Die Zyklenzahl liegt zwischen 20 und 40, je nach eingesetzter DNA-Menge. Denaturierungs- und Elongationstemperatur sind von der verwendeten Polymerase abhängig, während die Anlagerungstemperatur möglichst der Schmelztemperatur der Oligonukleotide entsprechend gewählt wird. Die Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide sollte nicht zu weit auseinander liegen und ist annähernd mit folgender Formel, der Wallace-Regel zu berechnen:

$$T_m = (4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T))^\circ\text{C}$$

Die Elongationszeit ist von der Länge des zu amplifizierenden Fragments abhängig, die PhusionTM High-Fidelity DNA-Polymerase benötigt zur Synthese von 1000 bp 15-30 s.

Zur Amplifikation wird die cDNA-Menge (20 µl) halbiert und in zwei parallelen PCRs amplifiziert.

PCR-Ansatz für IgM:

10 µl cDNA
1 µl dNTP (10 mM)
10 µl 5x Phusion HF Buffer
0,5 µl 50 mM MgCl ₂
2,5 µl V _H L-Oligonukleotide-Mischung (10 pmol/L)
2,5 µl C _µ -Oligonukleotid (10 pmol/L)
23 µl dH ₂ O

PCR-Ansatz für IgG:

10 µl cDNA
1 µl dNTP (10 mM)
10 µl 5x Phusion HF Buffer
0,5 µl 50 mM MgCl ₂
2,5 µl V _H L-Oligonukleotide-Mischung (10 pmol/L)
2,5 µl C _γ -Oligonukleotid (10 pmol/L)
23 µl dH ₂ O

Polymerase: 0,5 µl Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase

PCR-Programm: 25 Zyklen

Anfangsdenaturierung	1 Min	98°C
	Pause (Enzymzugabe)	68°C
Denaturierung	50 s	98°C
Anlagerung	30 s	61°C
Elongation	30 s	72°C
Finale Extension	5 Min	72°C

erwartete Produktgröße: ca. 550 bp

2.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um die PCR-Produkte anschließend weiterverarbeiten zu können, müssen zuerst die Polymerase-, Puffer-, dNTP-Reste und vor allem die Oligonukleotide entfernt werden und das PCR-Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Anleitung des Herstellers (Qiagen) aufgereinigt werden.

2.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach PCR-Amplifikation erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im Rückgrat der DNA diffundiert die DNA-Fragmente zum positiv geladenen Pol; wobei kleine DNA-Fragmente sich schneller bewegen als größere. Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente verwendet man Gele mit einem Agaroseanteil von 0,8% bis 2,0%, wobei große DNA-Fragmente auf Gele mit geringere Agaroseanteile aufgetrennt werden.

Zur Visualisierung der DNA werden 5 µl PCR-Ansatz zusammen mit 1 µl 6x Orange DNA Loading Dye (Fermentas) in die Taschen eines 2%-iges TAE-Agarose-Gels aufgetragen und mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Für ein 2%-iges TAE-Agarose-Gel werden 2 g Agarose (Roth) in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht, mit 10 µl GelRed™ (Biotium, Hayward, Vereinigte Staaten) versetzt und in einer Kammer mit Taschen zum Aushärten gebracht. Zur Analyse der Fragmentlängen wird die Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas) verwendet. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei 80 bis 120 V/cm und dauerte 45 bis 60 Min. Zur Dokumentation werden die Gele unter einer UV-Lampe fotografiert.

2.2.7 Klonierung

pGEM-T easy Cloning-Kit (Promega, Madison, Vereinigte Staaten) ist ein geeignetes System zur Klonierung von PCR-Produkten. Der pGEM-T easy Vektor ist linearisiert mit 3'-terminalen Thymidinen an beiden Enden, daher müssen zu ligierende PCR-Produkte terminal 3'-Adenin tragen. Die 3'-T Überhänge erhöhen die Effizienz der Ligation, also die enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA-Fragmente, da es eine Rezirkulierung des Vektors minimiert. Zwei RNA-Polymerase-Promotoren flankieren die Linearisierungsstelle des Vektors, in der auch die codierende Region des Enzyms β -Galaktosidase liegt. Insertionsbedingte Inaktivierung des Gens erlaubt die Identifizierung der Bakterien mit rekombinanter DNA durch Farbmarkierung (blau/weiß-Selektion). Die β -Galaktosidase spaltet den gelben Farbstoff X-Gal in einen blauen Farbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo) und Galactose.

Um zu testen, dass sowohl die V-Gen-PCR als auch die Herstellung der Amplicon Library funktioniert, werden die jeweiligen PCR-Produkte sequenziert. Dazu werden sie in den pGEM-T easy Vektor kloniert. Zur Klonierung wird ein 3:1 Insert:Vektor-Verhältnis benötigt, dazu wird die DNA-Konzentration der aufgereinigten PCR-Produkte bestimmt.

$$\frac{50 \text{ ng Vektor} \times 0,6 \text{ kb Insert}}{3 \text{ kb Vektor}} \times \frac{3}{1} = 30 \text{ ng Insert}$$

2.2.7.1 Anhängen von Adenin (*engl.: A-Adding*)

Zur Ligation in den pGEM-T easy Vektor wird Adenin an die 3'-Enden der PCR-Produkte angefügt.

Ansatz: 30 ng PCR-Produkt (Insert)
 2 μ l 2 mM dATP (Fermentas, Thermo Scientific)
 2 μ l 10x Taq-DNA-Polymerase-Buffer (Fermentas, Thermo Scientific)
 1,2 μ l 25 mM MgCl₂ (Fermentas, Thermo Scientific)
 ad dH₂O (gesamt: 20 μ l)

Polymerase: 0,1 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l) (Fermentas, Thermo Scientific)

Programm: 72°C, 20 Min.

Anschließend wird das Insert aufgereinigt. Hierzu wird die DNA zusammen mit 3 M Natriumacetat (10% der Gesamtmenge) und 50 μ l 100% Ethanol gemischt und 30

Minuten, gekühlt bei 12.000 x g pelletiert. Das Pellet nochmals mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend das getrocknete DNA-Pellet in 3 µl dH₂O gelöst.

2.2.7.2 DNA-Ligation

Zwei geschnittene DNA-Fragmente (Insert und Vektor) werden mit der T4-DNA-Ligase miteinander verbunden, die eine Phosphodiesterbindung zwischen dem freien 3'-OH-Ende eines Fragments mit dem 5'-Phosphatende des anderen generiert.

Ansatz	3 µl präzipitiertes PCR-Produkt (Insert) 1 µl pGEM-T easy Vektor (Promega) 5 µl 2x Rapid-Ligations-Puffer (Fermentas) ad 10 µl dH ₂ O
Polymerase	1 µl T4-DNA-Ligase (3 U/µl) (Fermentas)
Programm	4°C, über Nacht

2.2.7.3 Transformation

XL1-blue (Stratagene, La Jolla, Vereinigte Staaten) sind Tetracyclin resistente, chemisch kompetente E. coli Bakterien, die zur Vermehrung von Plasmiden oder Lambda-Phagen-Vektoren geeignet sind. Sie ermöglichen eine blau/weiß-Selektion, da sie durch eine Mutation ein funktionsunfähiges β-Galactosidase Gen enthalten.

Die ligierte DNA wird mittels Standardprotokoll von Stratagene in XL1-blue eingebracht. Die einzige Änderung von diesem Protokoll ist, dass nur 20 µl Bakteriensuspension und 3 µl Ligationsansatz verwendet wird. Zur Detektion der Bakterien mit rekombinanten Vektoren wird die blau/weiß-Selektion verwendet. Die Bakterien werden zusammen mit 100 µl 0,1 M IPTG (Invitrogen, Carlsbad, Vereinigte Staaten) und 50 µl 20 mg/ml X-Gal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten) auf eine Ampicillin-Agaroseplatte ausgestrichen, wobei man nach 16 Std. nur ganz weiße Bakterien ausgewählt werden.

2.2.7.4 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation ist eine molekularbiologische Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.

Jede Bakterienkolonie wird einzeln von der Agaroseplatte mit einer gelben Pipettenspitze gestrichen und in ein Reaktionsgefäß (13 ml Röhre mit Belüftungsstopfen von Sarstedt) mit 3 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium (100 µg/ml) überführt. Anschließend werden die Bakterien schüttelnd für 16 Std. bei 30°C kultiviert. Die Bakterien werden bei 10.000 x g aus der Suspension pelletiert, und das Bakterienpellet in E1-Resuspensionspuffer (Qiagen) aufgenommen, in E2-Lysisbuffer (Qiagen) lysiert und mit E3-Neutralisationspuffer (Qiagen) wird die Lyse gestoppt. Die Zelltrümmer werden mit 10.000 x g zentrifugiert und die DNA aus dem Überstand mit Isopropanol gefällt. Anschließend wird die DNA mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, das Pellet getrocknet und in 30 µl dH₂O aufgenommen.

2.2.8 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die DNA-Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Ähnlich wie bei der PCR synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend vom Oligonukleotid, den zum Template komplementären Strang. Es wird pro Ansatz nur ein Oligonukleotid verwendet, entweder ein Strang abwärts oder Strang aufwärts orientiertes Oligonukleotid. Neben den normalen dNTPs werden auch noch farbstoff-markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet, denen die 3'-Hydroxylgruppe fehlt; wobei ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP jeweils eine eigene Fluoreszenzfarbe haben. Die DNA-Polymerase synthetisiert einen Strang, indem sie das 3'-OH-Ende des letzten Nukleotids mit dem 5'-Phosphatende eines neuen Nukleotids verbindet. Da aber die DNA-Polymerase nicht zwischen einem dNTP und einem ddNTP unterscheiden kann, werden beide Nukleotidarten eingebaut. Durch die fehlende 3'-OH Gruppe kann an ein ddNTP kein weiteres Nukleotid angeknüpft werden und es kommt zum Kettenabbruch. Da die ddNTPs willkürlich eingebaut werden, entstehen DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Längen.

Sequenzierungsansatz:

- 2 µl Plasmid DNA (150 – 300 ng)
- 0,75 µl 1,26 µM M13 Oligonukleotid (Promega)
- 3,75 µl 5X BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Buffer (Applied Biosystems)
- 1 µl BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Premix (Applied Biosystems)
- 12,5 µl dH₂O

Sequenzierpogramm: 24 Zyklen

Anfangsdenaturierung	4 Min	96°C
Denaturierung	15 s	95°C
Anlagerung	10 s	50°C
Elongation	4 Min	60°C
Finale Extension	∞	10°C

Nach der Synthese werden die DNA-Fragmente aufgereinigt. Hierzu wird die DNA zusammen mit 3 M Dextranblau-haltigem Natriumacetat (10% der Gesamtmenge) und 100% Ethanol gemischt und 30 Minuten bei 4°C und 12.000 x g pelletiert. Das Pellet wird nochmals mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die Sequenzreaktion wird mit dem ABI Prism 3130 Genetik Analyser (Applied Biosystems / Hitachi) analysiert.

2.2.9 Herstellung der Amplicon Library

Um die V-Gene mittels Roche 454 unidirektional zu sequenzieren, werden zwei unterschiedliche Oligonukleotide, spezifisch für das GS FLX Titanium emPCR Kit (Lib-L) (Roche, Ebersberg, Deutschland), an die V-Gene angefügt. Die Sequenzierung erfolgt unidirektional vom C-Terminus zur Leitpeptidsequenz des V-Genes. Am Anfang der Sequenz, zwischen dem 454-Oligonukleotid und der C-Region, liegt ein 6 bp langer Barcode, unterschiedlich für jedes Replikat und jeden Spender. Pro Gedächtnis-B-Zellpopulation wurden zwei Replikate gesammelt, die jeweils einen eigenen Barcode bekommen; pro Spender sind acht verschiedene Barcodes vorhanden. Barcodes A und B kodieren für Spender 1, Barcodes C und D kodieren für Spender 2. Die für die Sequenzierung notwendigen Oligonukleotide werden mittels PCR angefügt, als Template wird das aufgereinigte PCR-Produkt aus der V-Gen-PCR verwendet. Die Anlagerungstemperatur wird beibehalten. Die Primer-A-Key und Primer-B-Key Sequenzen (454-Oligonukleotide) binden nicht an das PCR-Produkt sondern ragen über das V-Gen-PCR-Produkt heraus.

Matherial und Methoden

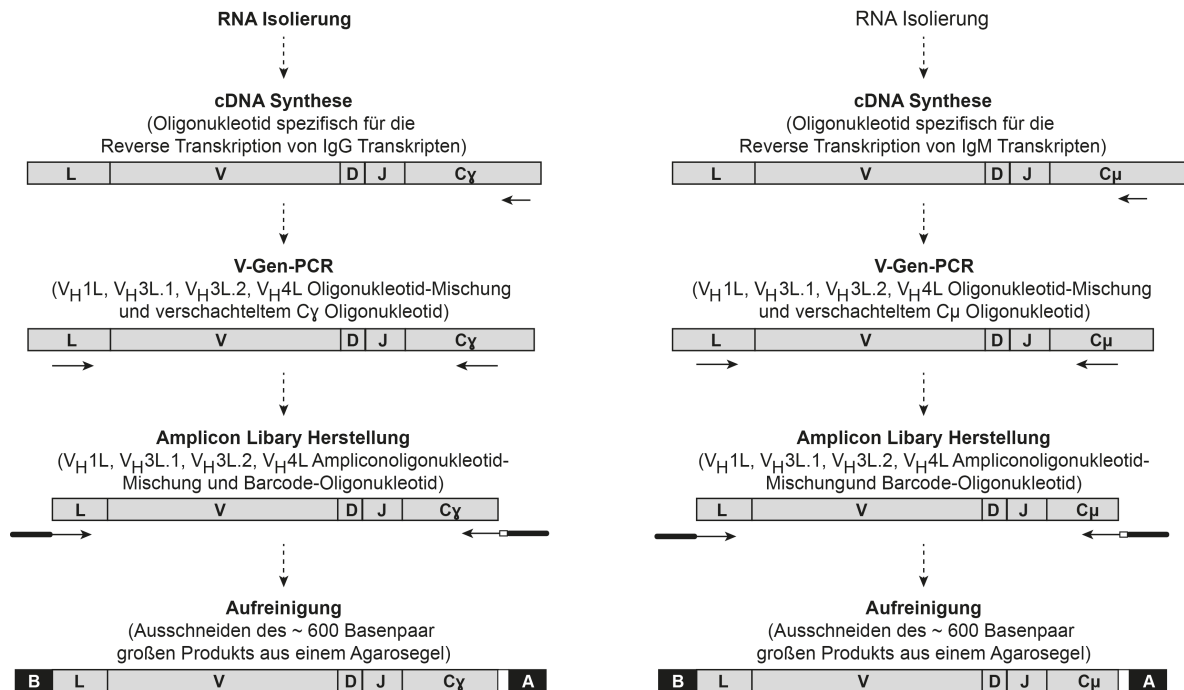


Abb.: 2.2 Herstellung der Amplicon Library: RNA wird aus den sortierten Zellen isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die RT-PCR werden entweder IgM- oder IgG-spezifische Oligonukleotide verwendet. Die cDNA wird mit V_HL-spezifischen (IGHV Familien 1, 3 und 4) und verschachtelten IgM- / IgG-spezifischen Oligonukleotiden vermehrt. Zur Herstellung der Amplicon Library werden Fusionsoligonukleotide verwendet, diese enthalten die gleiche Sequenz der PCR-Oligonukleotide jedoch noch zusätzlich eine Roche454-spezifische Bindungssequenz für unidirektionales Sequenzieren. Die Roche454 IgM- / IgG-spezifischen Oligonukleotide enthalten ein 6 Nukleotide umfassender Barcode.

PCR-Ansatz:

- 2 µl aufgereinigtes V-Gen-PCR-Produkt
- 1 µl dNTP (10 mM)
- 10 µl 5x Phusion HF Buffer
- 0,5 µl 50 mM MgCl₂
- 2,5 µl V_HL-Oligonukleotide-Mischung (10 pmol/L)
- 2,5 µl Barcode- Oligonukleotid (10 pmol/L)
- 31 µl dH₂O

Polymerase: 0,5 µl DNA-Polymerase (Phusion)

PCR-Pogramm: 5 Zyklen

Anfangsdenaturierung	1 Min	98°C
	Pause (Enzymzugabe)	68°C
Denaturierung	50 s	98°C
Anlagerung	30 s	61°C
Elongation	30 s	72°C
Finale Extension	5 Min	72°C

erwartete Produktgröße: ca. 600 bp

Zur Aufreinigung der Amplicon Library werden 50 µl PCR-Ansatz zusammen mit 10 µl 6x Orange DNA Loading Dye (Fermentas) auf ein 2%-iges TAE-Gel aufgetragen und bei 120 V/cm aufgetrennt. Die gewünschten DNA-Fragmente von ~600 Basenpaaren werden aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gelextraktions-Kit QIAquick (Qiagen) aufgereinigt. Die Produktmenge wird mit Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen) gemessen und die Gedächtnis-B-Zell-Populationen anteilig Ihrer Zellzahl gemischt. Zur Gewinnung von 1 µg Library cDNA werden mehrere Amplicon-PCRs eines Replikates erstellt.

2.2.10 Next-Generation-Sequencing (NGS) mit Roche 454 GS-FLX+ Titanium

Die Sequenzierung wurde von der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Es wurden pro Spender 1 µg der Amplicon Library sequenziert. Zur Vorbereitung der Sequenzierung wird eine Emulsions-PCR (emPCR) gemacht. Dabei wird die Amplicon Library denaturiert und mit 454 Beads der Firma Roche (GS FLX Titanium emPCR Kit (Lib-L)) 1:1 gemischt, so dass an jedes Bead nur ein DNA-Einzelstrang-Molekül mit seinem Primer-A-Key gebunden ist. Der wässrigen Mischung werden alle für die PCR notwendigen Substanzen aus dem GS FLX Titanium emPCR Kit (Lib-L) zugefügt und zusammen mit Öl wird eine Emulsion erzeugt, bei der die wässrige Phase Blasen in der Öl-Phase bildet, diese Blasen enthalten immer nur ein Bead. So kann durch die anschließende PCR ein einzelnes DNA Molekül über das gesamte Bead vervielfältigt werden. Die Beads werden anschließend zusammen mit Sulfurylase, Luziferase und DNA-Polymerase auf eine Picotiter Platte mit ~29 µm großen Vertiefungen gegeben. Roche 454 arbeitet nach der Methode der Pyrosequenzierung auch „Sequenzieren bei der Synthese“ genannt; dazu wird als Oligonukleotid der Synthese der Primer-B-Key verwendet. Anschließend werden immer die vier Nukleotide Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin in gleichbleibender Reihenfolge über die Platte (Flowcell) gegeben. Kann das angebotene Nukleotid eingebaut werden, entsteht ein freies Diphosphat, das von der Sulfurylase zusammen mit APS zu ATP umgewandelt wird. Die Luziferase wiederum verwendet das ATP um aus Luziferin Licht zu erzeugen. Wird mehr als ein Nukleotid eingebaut entstehen auch mehr als ein freies Diphosphat und der von der Luziferase erzeugte Lichtimpuls ist stärker. Dieses System ist allerdings endlich, somit liegt der Schwachpunkt dieser Sequenzierung in der Erkennung von mehreren aufeinander folgenden Nukleotiden der selben Base.

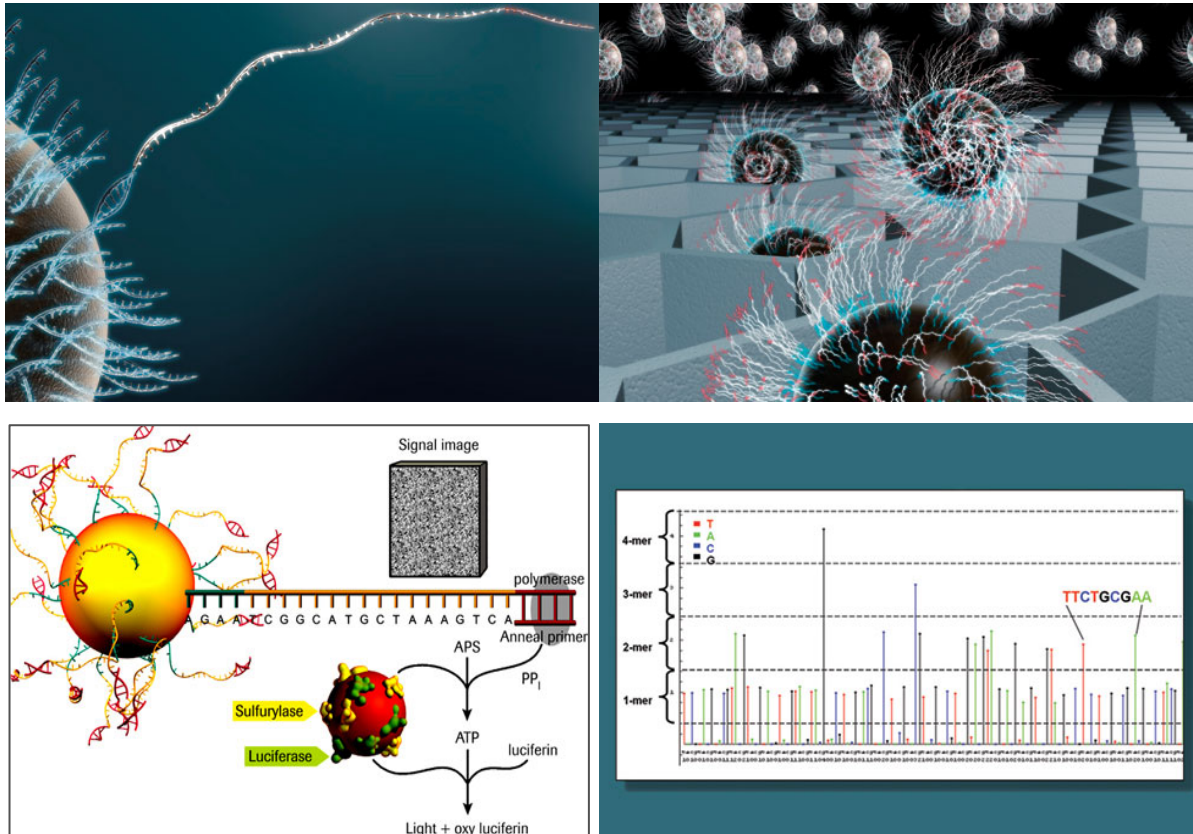


Abb.: 2.3 Schema des Roche 454 GS FLX+ Systems: **oben rechts** ist gezeigt wie ein DNA-Molekül an ein Bead bindet; **oben links** ist gezeigt wie das eine DANN-Molekül über das gesamte Bead vervielfältigt wurde und ein Bead in die Vertiefung der Sequenzer-Platte gelangt; **unten rechts** ist schematisch das Prinzip der Roche 454 Sequenzierung dargestellt; **unten links** ist Auslesung des Signals einer Roche 454 Sequenzierung gezeigt. Zu sehen ist, ob die selbe Base nacheinander einmal, zweimal, dreimal oder viermal vorkommt.

Quelle: <http://454.com/products/technology.asp>

Bei Spender 1 wurden 2 Roche/454 Platten sequenziert, das ergab 1.991.239 Reads (Sequenzen). Bei Spender 2 wurden erst 2 Roche/454 Platten sequenziert. Da deren Sequenzqualität, Sequenzlänge und vor allem deren Gesamtsequenzzahl nicht ausreichend war, wurde eine weitere 2 Roche/454 Platte sequenziert mit einer Gesamtanzahl von 2.129.205 Reads (Sequenzen). Die Sequenzen wurden von LGC Genomics nach Barcode sortiert.

2.3 Bioinformatische Auswertung

Alle nachfolgenden bioinformatischen Prozessierungsmethoden wurden von der Bioinformatikerin Bettina Budeus speziell in dem Computerprogramm R geschrieben.

2.3.1 Bestimmung der IgG-Unterklassen

Für jede IgG-Sequenz wird die IgG-Unterklasse mit einer Abstandsberechnung zur Sequenz der C-Region ermittelt. Dazu wird die Anzahl an Änderungen berechnet, die benötigt wird, um eine gegebene Sequenz in je eine der vier IgG-Unterklassensequenzen zu überführen. Anschließend wird die Sequenz der IgG-Unterklasse zugeordnet, zu der sie die wenigsten Unterschiede aufweist. Unterschiede in der Sequenz zur IgG-Unterklassen sind möglich, da ein Primer für die PCR verwendet wurde, der sich über die Nukleotide 61-80 erstreckt. Unterschiede im Primerbindungsbereich können nicht gewertet werden, da Nukleotid 68 eine Wobble-Base (*engl. wobble = wackeln*) hat, d.h. die dritte Base eines Basentriplets kann aus jeder der vier verschiedenen Basen bestehen und die Aminosäuresequenz ändert sich nicht.

10 20 30 40 50 60 70 80

IgG1 CTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC

IgG2 CTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGC

IgG3 CTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC

IgG4 CTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGC

Abb.: 2.4 Sequenzen der IgG-Unterklassen

2.3.2 CDRIII-Länge

Die FR3 endet mit: TAT TAC TGT. Die CDRIII beginnt mit: GCG AGA und endet mit: TGG direkt danach folgt die FR4, die mit GGC beginnt.

2.3.3 Mutationsfrequenz

Zur Berechnung der Mutationsfrequenz wird jede Sequenz paarweise mit allen Allelen des V_H-Gen-Segments abgeglichen und dem Allel mit der höchsten Ähnlichkeit zugeordnet. Die Berechnung der Mutationsfrequenz erfolgt nur über den Bereich des V-Gen-Segments und mit der folgenden Formel:

$$\text{Mutationsfrequenz} = \left[\frac{100 \times \text{übereinstimmende Nucleotidanzahl im VH-Segment}}{\text{Nucleotidanzahl des VH-Segments} - \text{Anzahl der Insertionen}} - 100 \right] \times (-1)$$

2.3.4 R/S-Werte

Das R Packet CorMut wird zur Berechnung der Ka/Ks-Werte der Framework Regionen des V_H-Gen-Segments verwendet (Chen et al., 2004). Ka ist die Anzahl an Austauschsubstitutionen pro Codon verändernder Position. Ks ist die Anzahl an stillen Substitutionen pro Codon unverändernder Position. Das Verhältnis von Ka zu Ks wird jeweils separat für FR1, FR2 und FR3 berechnet. Ein niedriger Ka/Ks-Wert ist ein Indiz für einen Selektionsdruck auf Beibehaltung der Aminosäuresequenz.

2.3.5 Berechnung klonal verwandter Sequenzen

Zur Bestimmung der klonalen Verwandtschaft von Gedächtnis-B-Zell-Populationen wurde folgende Definition festgelegt: um davon ausgehen zu können, dass die Sequenzen einen gemeinsamen Vorläufer haben, müssen alle Sequenzen das Selbe V-Gen-Segment benutzen und es muss eine Homologie von 90% im Bereich der CDRIII und der FR4 vorliegen; zusätzlich wurde eine Längentoleranz von 5% über diesen Bereich erlaubt (siehe Kapitel 3.1).

Um als expandiert bezeichnet zu werden, müssen Sequenzen entweder aus zwei verschiedenen Replikaten oder Populationen stammen oder Sequenzen aus einem Replikat müssen sich mindestens durch zwei Substitutionen im V-Gen unterscheiden. Dadurch kann man die Anzahl an klonal verwandten Sequenzen insgesamt und die Sequenzanzahl expandierter Klone bestimmen. Klone lassen sich daher in drei verschiedene Kategorien unterteilen: 1. Klone, die Sequenzen aus verschiedenen Populationen enthalten; 2. Klone, die Sequenzen aus einer Population aber verschiedenen Replikaten enthalten und Klone, die Sequenzen nur eines Replikates enthalten, dafür aber mindestens zwei Nukleotidunterschiede enthalten. 3. Sequenzen die nur einmal gefunden wurden oder solche deren Schwestersequenz sich nicht in mindestens zwei Nukleotiden unterscheidet, werden als nicht expandiert bezeichnet.

2.3.6 Erstellung und Analyse genealogischer Bäume

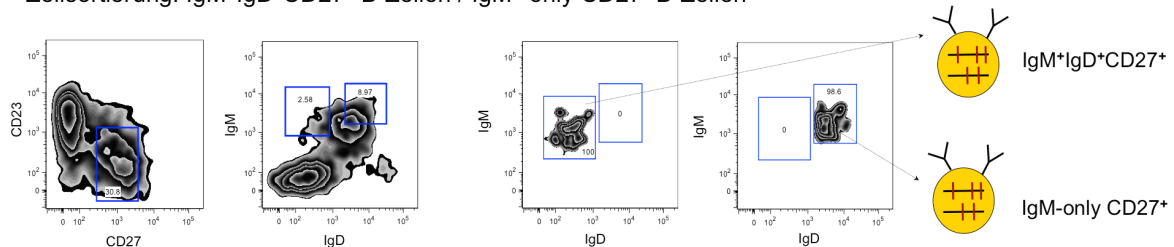
Genealogische Bäume (Mutationsbäume) werden aufgrund von Mutationsmustern klonal verwandter Sequenzen erstellt und sind eine graphische Rekonstruktion von Zellteilungsabfolgen. Sie repräsentieren die Phylogenese eines einzelnen Klonen. Phylogenetische Analysen (Barak et al., 2008) können mit Sequenzen, die aufgrund von Ähnlichkeiten in der CDRIII zu einem Klon zugeordnet wurden, mit dem IgTree[®] Programm (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ramit Mehr, Bar-Ilan Universität, Ramat-Gan, Israel) durchgeführt werden. Dem Programm liegt ein Abgleich der Sequenzen im Bereich des V_H-Gen-Segments mit dessen Keimbahnsequenz zugrunde. Bei allen Nukleotiden, die nicht mit der Keimbahnsequenz des jeweiligen V-Gens übereinstimmen, wird angenommen, dass sie durch somatische Hypermutation entstanden sind. Die CDRIII ist von dieser Analyse ausgenommen, da es für sie keine Keimbahnreferenz gibt. Alle Sequenzen eines Klons werden genealogisch ausgerichtet; der Mutationsbaum wurzelt in der Keimbahnsequenz und eine aufsteigende Zahl von gemeinsamen Mutationen korreliert mit dem Alter der Zellteilungsgeneration. Die Sequenzen werden so angeordnet, dass der Baumstruktur möglichst wenige Verzweigungen und Mutationereignisse zugrunde liegen. Es werden auch Ereignisse berücksichtigt wie mögliche Rückmutationen, die die Anzahl gemeinsamer Mutationen aufwiegen. In diesen Fällen wird zu Gunsten einer höheren Anzahl gemeinsamer Mutationen entschieden. Einige große genealogische Bäume werden manuell nachbearbeitet und gezeichnet.

Zur Berechnung der intraklonalen Diversität wird die mittlere Anzahl an Substitutionen aller Sequenzen eines Klons ermittelt. Diese wird aufgetragen gegen erste (früheste) Ebene mit maximaler Knotenanzahl, also die Ebene im Baum die das erste Mal die meisten Mitglieder aufweist.

ERGEBNISSE

Um den kontrovers diskutierten Ursprung von somatisch mutierten $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen im Menschen aufzudecken und die Verwandtschaft von $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ zu anderen Gedächtnis-B-Zell-Populationen zu klären, wurden vier verschiedene Gedächtnis-B-Zell-Populationen aus humanem Blut von zwei gesunden, erwachsenen Spendern durch FACS-Sortierung gewonnen. Die Gedächtnis-B-Zell-Populationen $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$, $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$, $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgM}^+\text{onlyCD27}^+$ wurden in zwei separaten Ansätzen, gefärbt und anschließend sortiert. Mittels Durchflußzytometrie wurde überprüft, ob die Reinheit der Zellsortierung nahe 100% betrug (Abb.: 3.1). Anschließend wurde die RNA

Zellsortierung: $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen / $\text{IgM}^+\text{onlyCD27}^+$ B-Zellen



Zellsortierung: $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen / $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen

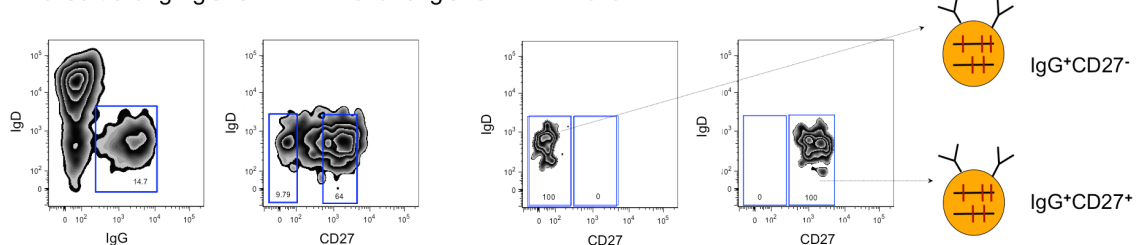


Abb.: 3.1 Zellsortier-Schema und Reinheitskontrolle der Zellsortierung: $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen: CD27^+ , CD23^- , $\text{IgM}^+/\text{IgD}^+$; $\text{IgM}^+\text{onlyCD27}^+$ B-Zellen: CD27^+ , CD23^- , IgM^+ ; $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen: CD27^+ , IgD^- , IgG^+ ; $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen: CD27^- , IgD^- , IgG^+ .

der sortierten Zellen isoliert und mittels C-Region-spezifischen Oligonukleotiden in cDNA transkribiert. Die IGHV-Gene der Familien 1, 3, 4 und 7 wurden anschließend mittels PCR vervielfältigt, dabei entstand ein Produkt mit einer ungefähren Länge von 600 Basenpaaren. Diese Amplifikation der IGHV-Gene wurde mit der Phusion-DNA-Polymerase in 25 Zyklen durchgeführt. Das amplifizierte PCR-Produkt begann am 5'-Ende mit dem Leitpeptid, es folgte die rekombinierten VDJ-Gene und endete am 3'-Ende mit dem ersten Exon der C-Region. Im letzten Schritt wurden durch Massiv-Parallel-Sequenzierung mit Roche 454 GS FLX Titanium die Immunglobulin-V-Regionen der vier B-Zell-Populationen ausgelesen. Für jede Population wurden zwei Replikate sortiert, jede

Population und jedes Replikat mit jeweils spezifischem Barcode. Die beiden Replikate der Populationen von Spender 1 wurden mit Probe A und B bezeichnet, die von Spender 2 mit Probe C und D. Der Vorteil zweier Replikate pro B-Zell-Population zu sequenzieren liegt darin, dass somit auch B-Zellen mit identischem Mutationsmuster als zwei separate Zellen gezählt werden konnten, da sie in zwei verschiedenen Ansätzen, d.h. mit zwei verschiedenen Barcodes detektiert wurden.

3.1 Prozessierung der NGS-Daten

Die statistische, computergestützte Analyse der Daten wurde von der Bioinformatikerin Bettina Budeus (Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen) durchgeführt, die biologische Prüfung wurde von mir (Stefanie Schweigle de Reynoso) vorgenommenen.

Das Ausgangsmaterial pro Spender waren 200.000 Zellen; sequenziert wurden ca. 2.000.000 Reads (engl.: Lesevorgang). In Tabelle 3.1 ist die Anzahl der Reads pro Population und Replikat angegeben.

Probe	IgG	IgG/CD27	IgMIgD/CD27	IgMonly/CD27
A	75.747	363.212	582.051	85.455
B	77.171	392.155	340.066	75.382
C	79.630	360.117	547.384	67.107
D	93.677	519.422	409.085	52.783

Tab.: 3.1 Sequenzanzahl der Rohdaten: Anzahl der Reads, die von der Firma LGC-Genomics geliefert wurden. Spender 1: Replikate A und B; Spender 2: Replikate C und D.

Die Längenverteilung der Reads, sowohl von Spender 1 als auch von Spender 2, hatte eine Spitze bei 500-550 Basenpaaren (Abb. 3.2), was der durchschnittlichen Länge der PCR-Produkte entsprach. Zuerst wurden Reads ausgeschlossen, die kürzer als 300 Basenpaare (bp) waren, da das die kürzest mögliche Länge des PCR-Produkts vom C-Primer bis zum V_H-Leader war. Dieser Schritt reduzierte die Anzahl der Reads auf 96% bei Spender 1 und 66% bei Spender 2.

Als nächstes wurden Reads mit schlechter Qualität entfernt. Jedem Read wurde eine Qualitätszahl zugewiesen. Generell gilt je kleiner die Zahl, desto besser ist die Qualität des Reads. Diese Qualitätseinstellungen garantierten eine niedrige 454-Fehlerwahrscheinlichkeit. Beim zweiten Spender war sowohl die Qualität der Reads

Ergebnisse

deutlich schlechter als auch die Länge der Reads kürzer, was sich durch eine deutlich geringeren Sequenzanzahl zeigte.

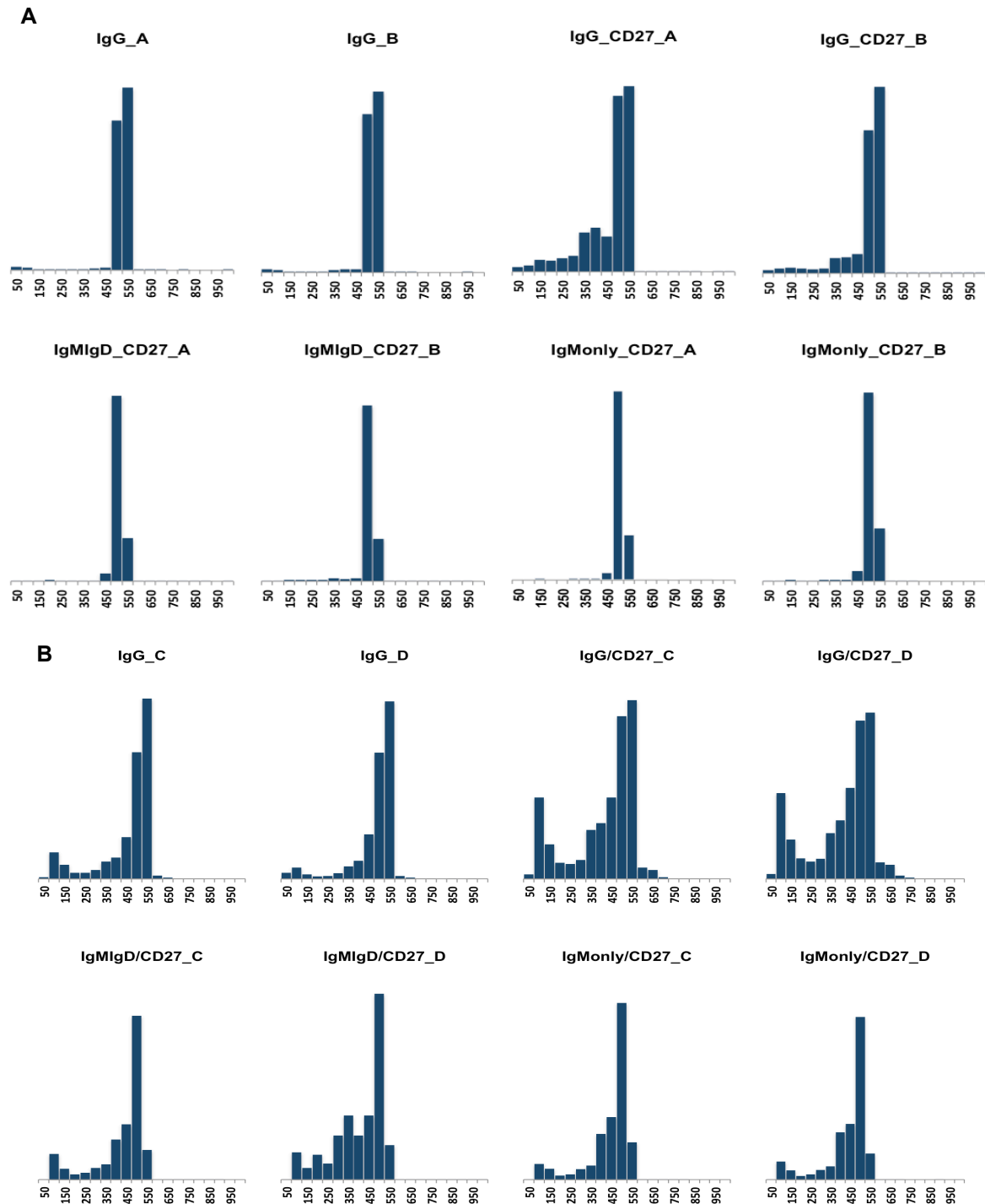


Abb.: 3.2 Längenverteilung der Reads: **A** Spender 1: Replikate A und B; **B** Spender 2: Replikate C und D. Darstellung der Länge aller von LGC Genomics gelieferten der Reads. Aufgetragen in bins (engl.: Behältnis) von 50 Basenpaaren (bp).

Um die Leitpeptidsequenz zu entfernen, wurde den Reads die verwendete V_H -Familie zugeordnet. Dazu wurden die Reads durch BLAST mit allen V_H -Gen-Segmenten abgeglichen und dem V -Gen-Segment mit der höchsten Ähnlichkeit (BLAST-Score)

zugeordnet. Durch den Abgleich konnte das erste Basentriplet der FR1 festgelegt werden; alle Basen 5' davon wurden aus dem Read entfernt. Reads, die keinem V-Gen-Segment zugeordnet werden könnten, wurden ebenfalls entfernt.

Anschließend wurden innerhalb einer Barcode-Gruppe alle Reads, die zu 100% identisch waren, zu einer Sequenz zusammengefasst. Dazu wurde die längste aller Sequenzen eines Replikates genommen und einer ersten Gruppe zugeordnet. Dann wurde die zweitlängste Sequenz mit der ersten verglichen. War die Sequenz zu 100% identisch, wurde für die erste Gruppe die Information abgespeichert, dass nun zwei Sequenzen enthalten waren. War die zweitlängste Sequenz nicht zu 100% mit der ersten identisch, eröffnete sie eine weitere Gruppe. Der Mechanismus wurde fortgeführt, bis alle Sequenzen einer Gruppe zugeordnet wurden. Um sicher zu gehen, dass die Sequenz kein Artefakt war und um möglichst viele Sequenzen in die Auswertung miteinbeziehen zu können und nahe an der sortierten Zellzahl zu bleiben, wurden nur Sequenzierdaten für die weitere Auswertung verwendet, die mindestens zweimal gefunden wurden (Tab.: 3.2). Sequenzen aller Replikate mit gleichem V-Gen-Segment wurden einem Kollektiv zugeordnet. Innerhalb dieser V_H -Kollektive wurde nach Klonen gesucht, dazu wurden Teilkollektive gebildet. Da alle Zellen eines Klon den selben Vorfahren haben, sind nicht nur die verwendeten V-, D- und J-Gen-Segmente gleich sondern auch deren Übergänge. Die Zugehörigkeit von Sequenzen zu einem Klon wurde aufgrund der Ähnlichkeit der CDRIII und FR4 festgestellt. Aufgrund eines Sequenzmotives konnte der Beginn der CDRIII detektiert werden. Da aufgrund der somatischen Mutationen im Bereich der CDRIII dessen Beginn und vor allem dessen Ende in vielen Sequenzen nicht eindeutig definiert werden konnte, und somit ein Großteil der Sequenzen von der Analyse ausgeschlossen werden müsste, wurde für die vorliegende Klonalitätsbestimmung der Bereich vom Ende der FR3 bis zum Beginn der C-Region genutzt und zur Validierung dieser Klonddefinition wurden Sequenzen mit 80%, 85%, 90% und 95% Homologie jeweils als klonal verwandt angesehen und mit Clustal W (Megalign von DNASTar, Madison, Wisconsin, USA) in einem Abgleich zusammengefasst (Yuan et al., 1999) und anschließend genealogisch an der Keimbahnsequenz mit aufsteigendem Mutationsmuster ausgerichtet. Zusätzlich wurden die Sequenzen mit Phylogenetic Tree (Megalign von DNASTar) analysiert. Es wurde untersucht, ob sich durch Mutationen einzelne Äste als eigene Klone definieren ließen. Dadurch konnte festgestellt werden, dass eine Homologie von 90% alle Sequenzen eines Klon enthielt und gleichzeitig große und divergente Klone nicht in zwei kleinere Klone aufgeteilt wurden. Da 454-Fehler häufig als Längenunterschiede der poly-N in den Sequenzen auftraten und auch durch somatische Hypermutation Insertionen und Deletionen eingefügt werden können, wurde auch eine Längentoleranz in diesem Sequenzabschnitt von 5% zugelassen.

Ergebnisse

Schwelle für die Zusammenfassung von Reads	IgG_A 8.000	IgG_B 8.000	IgG/CD27_A 45.000	IgG/CD27_B 45.000
≥ 2	7.710	6.949	21.155	20.271
≥ 3	5.184	4.726	13.722	14.122
≥ 4	3.858	3.565	9.785	11.280
≥ 5	2.925	2.818	7.236	9.451
≥ 6	2.238	2.236	5.447	8.133
≥ 7	1.746	1.822	4.191	7.111
≥ 8	1.394	1.502	3.281	6.273
≥ 9	1.122	1.259	2.590	5.533
≥ 10	917	1.058	2.090	4.903
	IgMlgD/CD27_A 50.000	IgMlgD/CD27_B 50.000	IgMonly/CD27_A 5.500	IgMonly/CD27_B 5.500
≥ 2	30.285	15.807	5.366	5.075
≥ 3	20.979	10.643	3.735	3.467
≥ 4	17.702	8.948	3.080	2.775
≥ 5	15.881	8.079	2.644	2.319
≥ 6	14.503	7.536	2.322	1.944
≥ 7	13.320	7.128	2.035	1.678
≥ 8	12.289	6.774	1.788	1.442
≥ 9	11.353	6.473	1.579	1.271
≥ 10	10.457	6.168	1.410	1.122
	IgG_C 10.000	IgG_D 10.000	IgG/CD27_C 46.000	IgG/CD27_D 46.000
≥ 2	4.549	6.038	13.534	16.068
≥ 3	1.983	2.981	6.676	9.132
≥ 4	1.049	1.775	4.024	6.352
≥ 5	627	1.125	2.594	4.711
≥ 6	391	743	1.810	3.621
≥ 7	261	504	1.311	2.814
≥ 8	183	365	969	2.236
≥ 9	135	260	745	1.807
≥ 10	97	193	586	1.476
	IgMlgD/CD27_C 50.000	IgMlgD/CD27_D 50.000	IgMonly/CD27_C 5.500	IgMonly/CD27_D 5.500
≥ 2	21.179	16.206	2.750	2.126
≥ 3	10.045	7.579	1.304	905
≥ 4	6.376	4.600	760	492
≥ 5	4.463	3.021	520	321
≥ 6	3.237	2.109	374	213
≥ 7	2.477	1.548	278	157
≥ 8	1.892	1.158	208	114
≥ 9	1.465	878	167	87
≥ 10	1.205	705	139	73

Tab.: 3.2 Anzahl 100% identischer Reads: Zahlen in den Spaltenüberschriften sind die Ausgangszellzahlen. ≥ 2 bedeutet Anzahl an Reads die mindestens zweimal gefunden wurden.

Durch das Sequenzieren mit Roche 454 FLX Titanium kommt es häufig zu artifiziellen Insertionen oder Deletionen, was zu einer irrtümlichen Vergrößerung der Variabilität führt. Um auch Sequenzen zusammenfassen zu können, die sich nur durch Insertionen oder Deletionen von einem Basenpaar unterscheiden, wurden alle Sequenzen eines Klons nach folgenden Kriterien miteinander abgeglichen: Zuerst wurde das Sequenzmotiv am Ende der CDRIII bestimmt. Dann wurden alle Sequenzen eines Teilkollektives im Bereich des V_H-Gen-Segments und dem nach der CDRIII liegenden JH-Gen-Segment verglichen. Fanden sich Sequenzen, die bis auf Insertionen und Deletionen identisch waren, wurden diese im Bereich der konstanten Region verglichen, waren sie auch dort identisch, wurde der Bereich der CDRIII überprüft, ob diese bis auf Insertionen oder Deletionen identisch waren. Da für die CDRIII keine Keimbahnreferenz existiert, wurde bei identischen Sequenzen überprüft, ob die Sequenzen im Leseraster waren oder durch Insertionen oder Deletionen eine Leserasterverschiebung vorlag. Die Sequenzen wurden dann zu derjenigen Sequenz zusammengefasst, die ein produktives Leseraster in der CDRIII aufwies. Gab es mehr als eine Sequenz auf die das zutraf oder hatten alle Sequenzen eine Verschiebung im Leseraster, wurde diejenige mit der höchsten Ähnlichkeit zur IGHV-Keimbahn verwendet. Sollte sich in einem der Vergleiche herausgestellt haben, dass die Sequenzen sich in Substitutionen unterschieden, wurden sie nicht zusammengefasst. In Tabelle 3.3 wird die Anzahl der Sequenzen pro Replikat angegeben, die für die weiteren Analysen verwendet wurde.

	IgG	IgG/CD27	IgMlgD/CD27	IgMonly/CD27
A	4.766	12.121	19.410	3.889
B	3.992	9.497	9.077	3.900
C	2.372	6.138	11.683	1.705
D	2.584	4.637	10.219	1.320

Tab.: 3.3 Sequenzanzahl der Replikate: Anzahl der Sequenzen die in die endgültige Auswertung einbezogen wurden. Spender 1: Replikate A und B; Spender 2: Replikate C und D.

3.2 Die V_H-Gen Nutzung der Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Der folgende Abschnitt behandelt die erste Evaluierung der NGS-Daten unter dem Aspekt der Qualitätskontrolle und V_H-Gen-Nutzung. Die von den Gedächtnis-B-Zell-Populationen verwendeten V_H-Gene wurde mittels eines Abgleichs mit den V-Gen-Sequenzen des IGH Locus bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Familien 1, 3, 4 und 7 amplifiziert. Diese Auswahl deckt etwa 90% der verwendeten humanen V_H-Gen-Segmente ab, insgesamt entspricht das 42 verschiedenen V_H-Gen-Segmenten. Das V_H-Gen einer jeden

Ergebnisse

Sequenz wurde durch einen Abgleich dem Keimbahn V_H -Gen-Segment zugeordnet mit dem es die meisten Übereinstimmungen hatte (*engl.: most likely hit*).

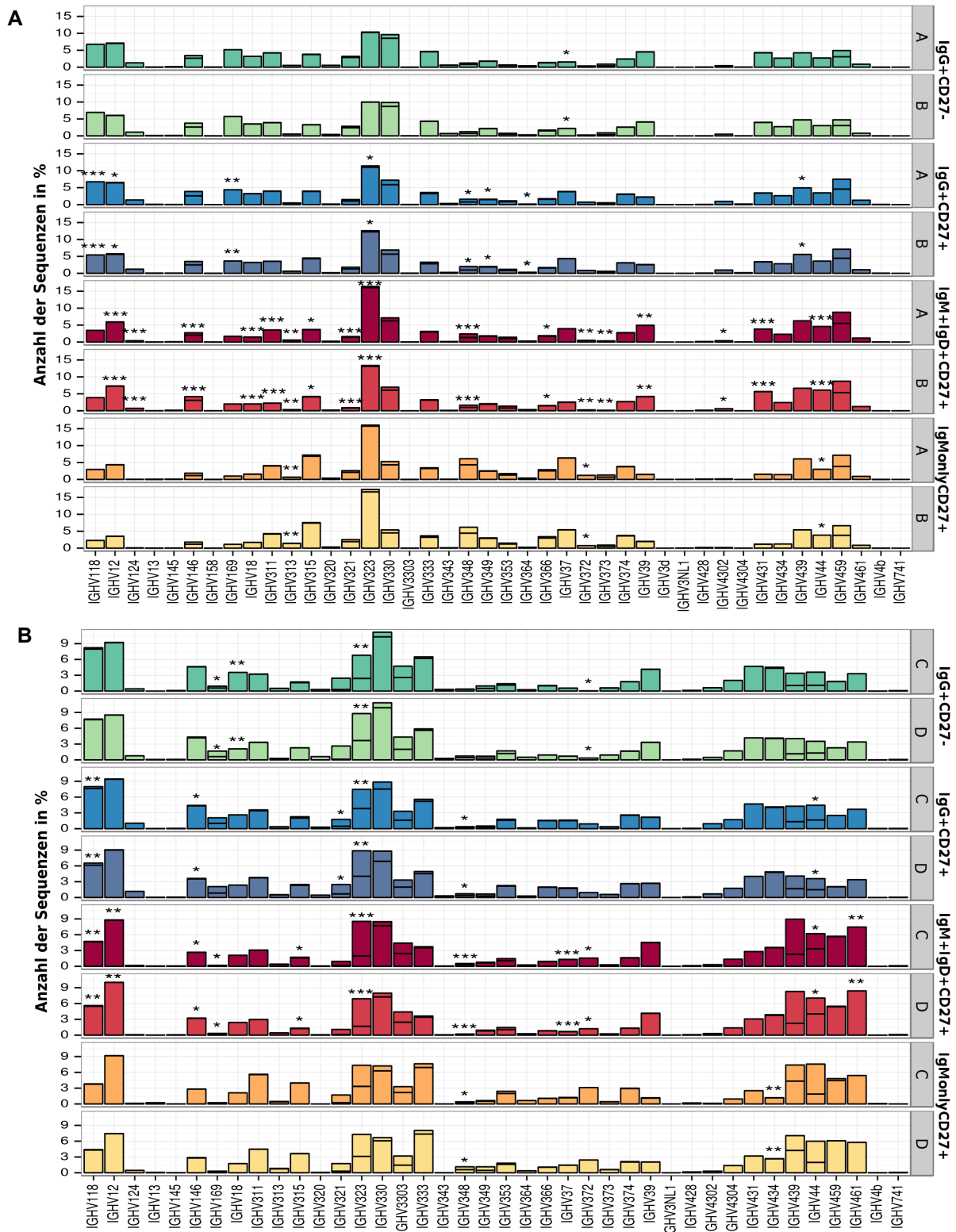


Abb.: 3.3 Nutzung der V_H -Gene: Aufgetragen ist die Anzahl der Sequenzen eines IGHV-Genes als Prozentanteil an der Gesamtanzahl eines Replikates. Die Unterteilung der Balken zeigt die anteilige Nutzung der beiden Allele, falls zwei distinkte Allele vorlagen. Am rechten Rand sind die Namen der Populationen aufgetragen. Signifikante Unterschiede in der Nutzung eines V_H -Gens zwischen den beiden Replikaten einer Population (Fischer's-Exact-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **A** Spender 1; **B** Spender 2.

In Abbildung 3.3 ist die Nutzung der V_H -Gene der vier Gedächtnis-B-Zell-Populationen dargestellt, unterteilt nach den beiden Replikaten. In der Grafik sind von jedem V_H -Gen die beiden vom Spender benutzten Allele als Unterteilung des Balkens dargestellt. In den meisten Fällen dominiert eines der beiden Allele, falls zwei distinkte Allele vorlagen. Bei Spender 1 wurden 42 (Abb.: 3.3 A), bei Spender 2 wurden 41 (Abb.: 3.3 B) verschiedene V_H -Gene (IGHV1-58 wurde nicht detektiert) detektiert. Die beiden Replikate einer Population dienten unter anderem als Qualitätskontrolle der PCR-Effizienz, da einzelne V_H -Gene in der PCR durch bessere Bindung an die Oligonukleotide bevorzugt vervielfältigt werden können. Mittels Fischer's-Exact-Test wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Stichproben bestimmt. Bei Spender 1 waren von 168 Vergleichen 29 signifikant unterschiedlich, bei Spender 2 waren von insgesamt 164 Vergleichen 23 signifikant unterschiedlich. Der p-Wert wurde nicht für multiples Testen angepasst, da das mit der Vielzahl an Vergleichen zu zeitaufwendig gewesen wäre und in der vorliegenden Arbeit die V_H -Gen Nutzung vornehmlich als Qualitätskontrolle diente.

Um die Stichprobengröße zu erhöhen und um die technisch induzierte Varianz zwischen Replikaten zu verkleinern, wurden die Replikate zusammengefügt (Abb.: 3.4); die beiden Stichproben sind dennoch weiterhin als Unterteilung der Balken gekennzeichnet. Mittels Fischer's-Exact-Test wurde getestet, ob sich die verwendeten V_H -Gene zwischen zwei Populationen unterscheiden. Der Fischer's-Exact-Test erlaubt nur paarweise Vergleiche, die Ergebnisse wurden in einer Tabelle aufgelistet (Tab.: 3.4). Bei Spender 1 waren von insgesamt 252 Vergleichen 105 signifikant unterschiedlich, bei Spender 2 waren von insgesamt 246 Vergleichen 73 signifikant unterschiedlich. Der p-Wert wurde nicht für multiples Testen angepasst. Dabei ist zu beachten, dass zum einen der Fischer's-Exact-Test sehr sensitiv ist und zum anderen die Unterschiede gerade bei geringfügig verwendeten V_H -Genen signifikant waren.

Beim nächsten Schritt wurde der 2-fache Expressionsunterschied in der V_H -Gen-Nutzung zwischen den Populationen angeschaut. Es konnte keine MANOVA erstellt werden, da dafür jedes benutzte V-Gen-Segment jeder Population eine Gaußverteilung haben muss. Da für manche V-Gen-Segmente nur eine geringe Sequenzanzahl detektiert wurde, konnte für diese keine Gaußverteilung gezeigt werden und somit konnte auch keine eine MANOVA angewendet werden. In der Abbildung 3.4 sind alle V_H -Gene markiert, die mindestens 2-fachen unterschiedlich zwischen zwei Gedächtnis-B-Zell-Populationen ausgeprägt waren. Zur Vereinfachung wurde nur die V_H -Gene mit einem Stern markiert, die mindestens 2-fach stärker exprimiert wurden. Dabei zeigten sich spenderabhängige Muster, dennoch waren einige V-Gene zwischen den Populationen konsistent bei beiden Spendern mindestens 2-fach unterschiedlich ausgeprägt. Zu beachten ist auch hier, dass gerade selten gefundene V_H -Gene mit wenigstens einem 2-fachen Unterschied zwischen

Ergebnisse

den Populationen ausgeprägt wurden, wurden im Folgenden nur Unterschiede mit mindestens 5% Sequenzanteil an der Gesamtanzahl gewertet. Bei Spender 1 ergab das 11 von 42 unterschiedlich ausgeprägte V_H-Gene zwischen zwei B-Zell-Population, bei Spender 2 9 von 41 unterschiedlich ausgeprägte V_H-Gene zwischen zwei B-Zell-Population.

	DONOR1						DONOR2					
	IgG / IgGCD27	IgGCD27 / IgMgDCD27	IgGCD27 / IgMonlyCD27	IgG / IgMgDCD27	IgG / IgMonlyCD27	IgMgDCD27 / IgMonlyCD27	IgG / IgGCD27	IgGCD27 / IgMgDCD27	IgGCD27 / IgMonlyCD27	IgG / IgMgDCD27	IgG / IgMonlyCD27	IgMgDCD27 / IgMonlyCD27
VH 1-18		***	***	***	***	*		***	***	***	***	
VH 1-2			***		***	***		***	**	***		
VH 1-24		***	***	***	***	***						
VH 1-3												
VH 1-45												
VH 1-46			***		***	***		***		***		
VH 1-58												
VH 1-69	***	***	***	***	***	*		***	***	***	***	
VH 1-8		***	***	***	***							
VH 3-11		*		*		**					*	***
VH 3-13			**			***						
VH 3-15			***		***	***		***	**		**	***
VH 3-20	**							***		***		
VH 3-21	***		***	***		***		***		***		
VH 3-23	**	***	***	***	***							
VH 3-30	***		***	***	***	***	*			***	***	
VH 3-303								***				
VH 3-33	**			***				***	***	***		***
VH 3-43	**			***	***			***		**		
VH 3-48			***	***	***	***						
VH 3-49			***			**						
VH 3-53				***	***							
VH 3-64												
VH 3-66			***		***	***		***				
VH 3-7	***		***	***	***	***	***	***				
VH 3-72	***	***			***	***	***		***	***	***	***
VH 3-73		***	**	***		***				***		
VH 3-74					***	**		***				*
VH 3-9	***	***			***	***	**	***			***	***
VH 3-NL1												
VH 3-d												
VH 4-28												
VH 4-302	**	***	***					***	*			
VH 4-304		***										
VH 4-31		***	***		***	***		***	*	***		
VH 4-34			***		***	***			***		***	***
VH 4-39		***		***				***	***	***	***	
VH 4-4		***		***		***		***	***	***	***	
VH 4-59	***	***		***	***	***		***	***	***	***	
VH 4-61								***	***	***	**	**
VH 4-b												
VH 7-41												

Tab.: 3.4 Nutzung der V_H-Gene: Signifikante Unterschiede in der Nutzung eines V_H-Gens im paarweisen Vergleich zweier Populationen (Fischer's-Exact-Test: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

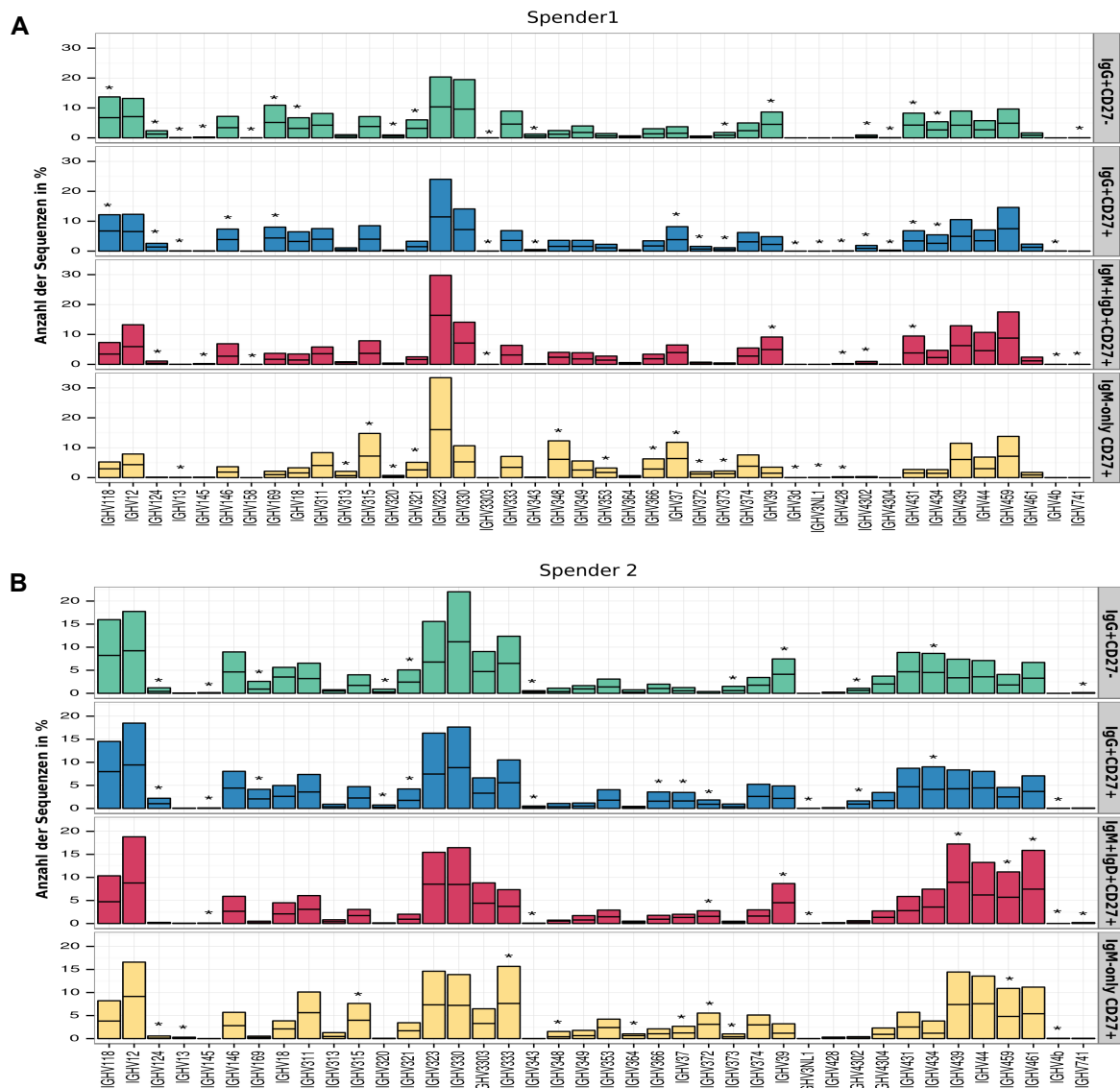


Abb.: 3.4 Nutzung der V_H -Gene: Aufgetragen ist die Anzahl der verwendeten IGHV-Gene als Prozentanteilen an der Gesamtanzahl einer Population. Die Unterteilung der Balken zeigt die anteilige Nutzung der beiden Replikate. Am rechten Rand sind die Namen der Populationen aufgetragen. mit * markierten Population: V_H -Gen wird 2-fach höher verwendet als bei einer der drei anderen. **A** Spender 1; **B** Spender 2

Die überwiegend gleichmäßige Verwendung der V_H -Gene zeigt, dass die Gedächtnis-B-Zell-Populationen sehr ähnlichen Selektionsdrücken unterlagen und somit ein gemeinsames Gedächtnis ähnlicher immunologischer Erfahrungen darstellen.

3.3 Die CDRIII-Länge der Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Die Längenverteilung der CDRIII kann als Hinweis auf Selektion dienen. Für jede der B-Zell-Populationen wurde die Nukleotidanzahl in der CDRIII Region bestimmt (Abb.: 3.5),

Ergebnisse

dargestellt im Verhältnis zum prozentualen Anteil der Sequenzen. Die beiden Replikate sind als Unterteilung der Balken abgebildet; der Mean jeder Population wird durch eine grüne Linie markiert. Nukleotidanzahlen, die nicht ganzzahlig durch 3 teilbar sind (d.h. nur aus Leserasterverschiebungen in der CDRIII stammen können), waren nur in sehr geringer Anzahl zu finden. Für jede der B-Zell-Populationen und für beide Spender waren die CDRIII-Längen parabelförmig, das heißt ähnlich einer Gauss-Verteilung um den Mean gestreut.

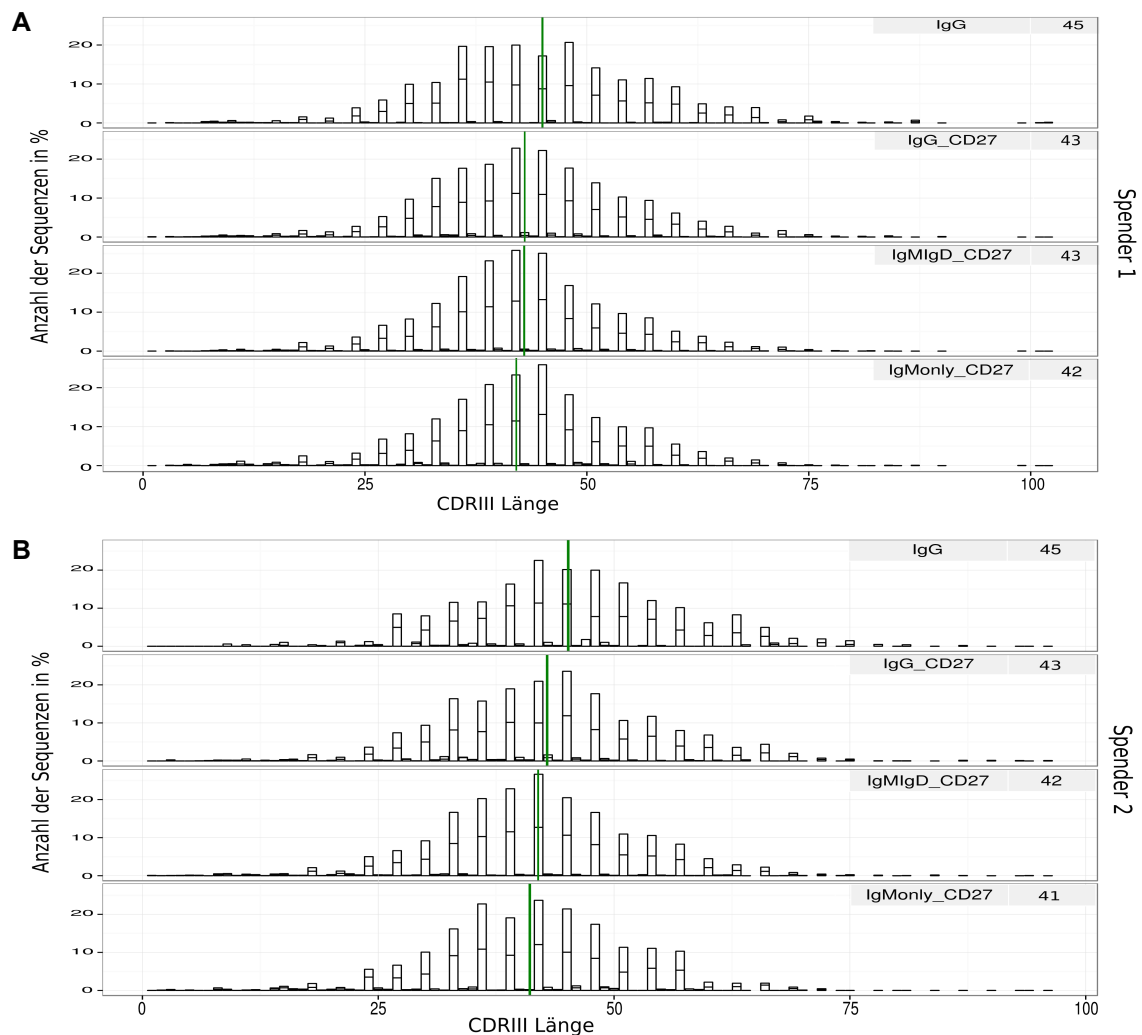


Abb.: 3.5 CDRIII-Länge: Nukleotidanzahl im Verhältnis zur Anzahl der Sequenz. Unterteilung der Balken zeigt die beiden Replikate. Mean = Grüne Linie / Nukleotidanzahl recht im grauen Kasten. **A** Spender 1; **B** Spender 2.

Da alle Populationen ähnliche, gleichförmige Verteilung ihrer CDRIII-Längen aufweisen, ist davon auszugehen, dass alle B-Zell-Populationen selektioniert wurden.

3.4 Die Mutationsfrequenz der Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Die durchschnittliche Mutationsfrequenz einer Population ist der Mittelwert der Mutationsfrequenzen aller Sequenzen dieser Population. Als Mutationsfrequenz wurde die Anzahl der Nukleotidaustausche einer Sequenz im Vergleich zum V_H-Gen-Segment der Keimbahn zum Verhältnis der Gesamtanzahl an Nukleotiden berechnet. Da durch die Roche-454-Sequenzierung häufig Insertionen und Deletionen eingefügt werden und es durch somatische Hypermutation sehr selten zu Insertionen und Deletionen kommt, wurden nur Nukleotidaustausche gewertet.

Die durchschnittliche Mutationsfrequenz unterschied sich zwischen den Populationen, war jedoch sowohl zwischen den Spendern als auch den Replikaten ähnlich (Abb.: 3.6). Die klassischen Gedächtnis-B-Zellen (IgG⁺CD27⁺) hatten die höchste durchschnittliche Mutationsfrequenz (A: 7,56%; B: 7,45%; C: 7,36%; D: 7,43%), wohingegen die CD27-negativen, klassengewechselten B-Zellen deutlich niedriger mutiert waren (A: 3,39%; B: 3,34%; C: 3,70%; D: 3,29%) und die meisten unmutierten Sequenzen besaß. Die durchschnittliche Mutationsfrequenz der IgM⁺IgD⁺ Gedächtnis-B-Zellen (A: 3,59%; B: 3,71%; C: 3,85%; D: 3,82%) lag niedriger im Vergleich zu den klassischen Gedächtnis-B-Zellen. Die Mutationsfrequenz der IgM-only B-Zellen (A: 5,02%; B: 5,07%; C: 4,91%; D: 4,87%) lag zwischen der der klassischen Gedächtnis-B-Zellen und der IgM⁺IgD⁺ Gedächtnis-B-Zellen.

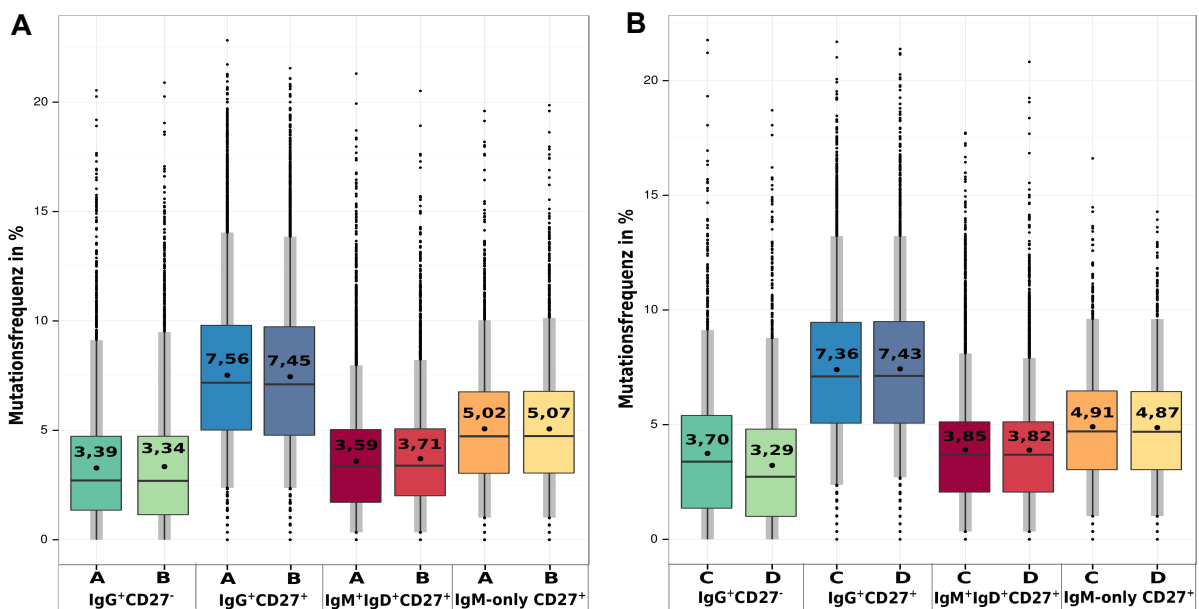


Abb.: 3.6 Durchschnittliche Mutationsfrequenz der Gedächtnis-B-Zell-Populationen: Dargestellt sind die Mutationsfrequenzen als Nukleotidaustausche zur Keimbahn in Prozent zur Gesamtlänge. Am rechten Rand sind die Namen der Populationen aufgetragen. Whisker Plot: farbige Boxen 50% der Sequenzen; graue Boxen 95% der Sequenzen; Punkte 2.5% der Sequenzen. **A** Spender 1: Replikate A und B; **B** Spender 2: Replikate C und D.

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob die Gedächtnis-B-Zell-Populationen aus einer oder zwei Subpopulationen bestanden, zum Beispiel einer niedrig bzw. unmutierten und einer durchschnittlich höher mutierten, wurde die Verteilung der Mutationsfrequenz gegen die Anzahl der Sequenzen pro Replikat aufgetragen (Abb.: 3.7). Alle Gedächtnis-B-Zell-Populationen zeigten eine homogene Kurve, die ihren höchsten Punkt bei der durchschnittlichen Mutationsfrequenz der jeweiligen Population hatte. Da jedoch große *Bins* gewählt wurden, könnten Populationen mit nahe beieinander liegenden Mittelwerten nicht erkannt werden.

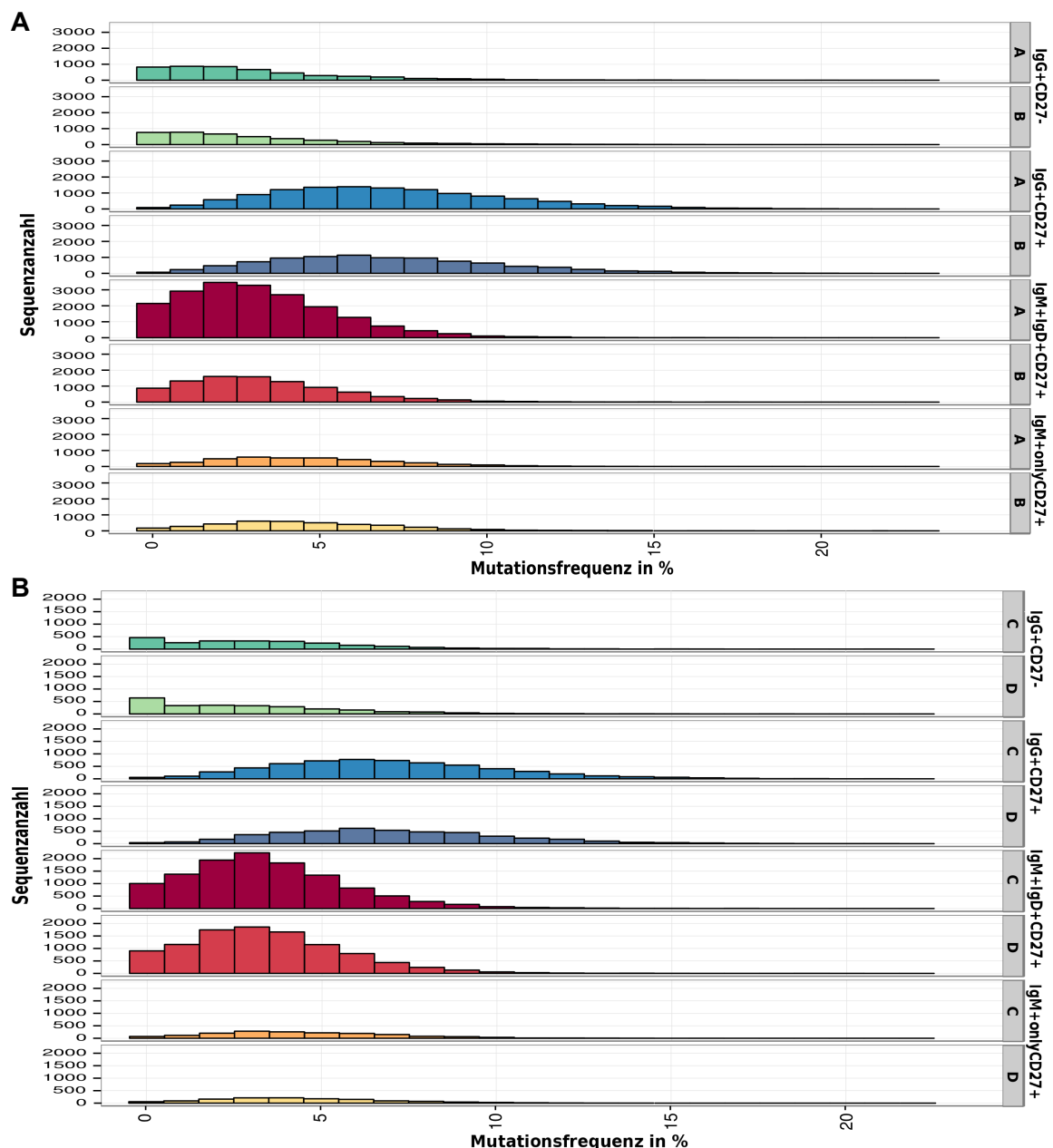


Abb.: 3.7 Mutationsverteilung der Gedächtnis-B-Zell-Populationen: Dargestellt als prozentuale Mutationsfrequenz aufgetragen zur Sequenzanzahl. Am rechten Rand sind die Namen der Populationen aufgetragen. **A** Spender 1: Replikate A und B; **B** Spender 2: Replikate C und D.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass alle Populationen unterschiedliche Mutationsfrequenzen haben, die beiden Replikate jeder Population waren jedoch sehr ähnlich.

3.5 Die R/S-Werte der Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Im folgenden Abschnitt werden die R/S-Wert (*engl.: R: replacement* = austausch; *S: silent* = still) als ein Maß für Selektion behandelt. Zur Berechnung der R/S-Werte setzt man die Anzahl an Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, im Vergleich zu Mutationen, die keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz haben. In dieser Arbeit wurde anstelle des R/S-Werts der K_a/K_s -Wert verwendet, bei dem die R/S-Werte zusätzlich auf die Zusammensetzung des Aminosäuretriplets normiert werden. K_a ist die Anzahl an Austauschsubstitutionen pro Codon verändernder Position. K_s ist die Anzahl an stillen Substitutionen pro Codon unverändernder Position. Die K_a/K_s -Werte wurden nur für die drei Gerüstregionen der Immunglobuline berechnet. In den Gerüstregionen muss eine Austausch-Mutation in den meisten Fällen gegenselektiert werden, da ansonsten sowohl die Funktion als auch die Stabilität und Form des Immunglobulins verloren geht. Unmutierte Sequenzen haben einen K_a/K_s -Wert von 1, da diese keine Substitutionen

	FR1	FR2	FR3	gesamt
IgG_A	0,97	0,96	0,94	0,96
IgG_B	0,97	0,96	0,95	0,96
IgG_C	0,96	0,96	0,94	0,95
IgG_D	0,97	0,96	0,94	0,96
IgG/CD27_A	0,94	0,92	0,89	0,91
IgG/CD27_B	0,94	0,92	0,89	0,91
IgG/CD27_C	0,92	0,91	0,88	0,91
IgG/CD27_D	0,92	0,91	0,88	0,90
IgMlgD/CD27_A	0,97	0,96	0,94	0,96
IgMlgD/CD27_B	0,97	0,96	0,94	0,96
IgMlgD/CD27_C	0,96	0,95	0,93	0,95
IgMlgD/CD27_D	0,96	0,95	0,93	0,95
IgMonly/CD27_A	0,96	0,94	0,92	0,94
IgMonly/CD27_B	0,96	0,94	0,92	0,94
IgMonly/CD27_C	0,95	0,94	0,92	0,94
IgMonly/CD27_D	0,95	0,94	0,92	0,94

Tab.: 3.5 K_a/K_s -Werte: Dargestellt jeweils separat für FR1, FR2 und FR3 jeder Gedächtnis-B-Zell-Population. Spender 1: Replikate A und B; Spender 2: Replikate C und D.

Ergebnisse

enthalten. Einen K_a/K_s -Wert von <1 haben selektionierte Sequenzen, da diese mehr stille Mutationen (K_s) als Austauschmutationen (K_a) enthalten. Die gefundenen K_a/K_s -Werte der FR waren sowohl zwischen den Replikaten als auch zwischen den Spendern konsistent ähnlich (Tab.: 3.5).

Alle Populationen haben K_a/K_s -Werte <1 , tragen mehr stille Mutationen und Aminosäureaustauschmutationen wurden gegenselektioniert. Somit ist davon auszugehen, dass sie alle unter ähnlichem Selektionsdruck gestanden haben, der eine Veränderung der Gerüstregionen unterbindet.

3.6 Klonale Verwandtschaft von B-Zell-Populationen

Zur Bestimmung der klonalen Zusammensetzung, Komplexität und Verwandtschaft von Gedächtnis-B-Zell-Populationen wurden zwei Merkmale verwendet. Sequenzen, die zu einem Klon gehören, mussten erstens das gleiche V-Gen-Segment benutzen und zweitens eine Ähnlichkeit von mindestens 90% in der Nukleotidsequenz der CDRIII aufweisen (siehe Abschnitt 3.1). Als klonal expandiert wurden Sequenzen definiert, die 1. entweder von verschiedenen Populationen oder Replikaten stammen oder 2. aus einem Replikat stammten, dann jedoch mit mindestens zwei Substitutionsunterschieden.

In Abbildung 3.8 ist die Unterteilung aller Sequenzen in klonal expandierte oder nicht expandierte zu sehen. Nach oben genannten Kriterien waren bei Spender 1 45% aller Sequenzen klonal expandiert, bei Spender 2 waren 44% aller Sequenzen klonal expandiert. Bei Spender 1 wurden 7% aller Sequenzen gemischten Klonen zugeordnet, bei Spender 2 waren es 3%.

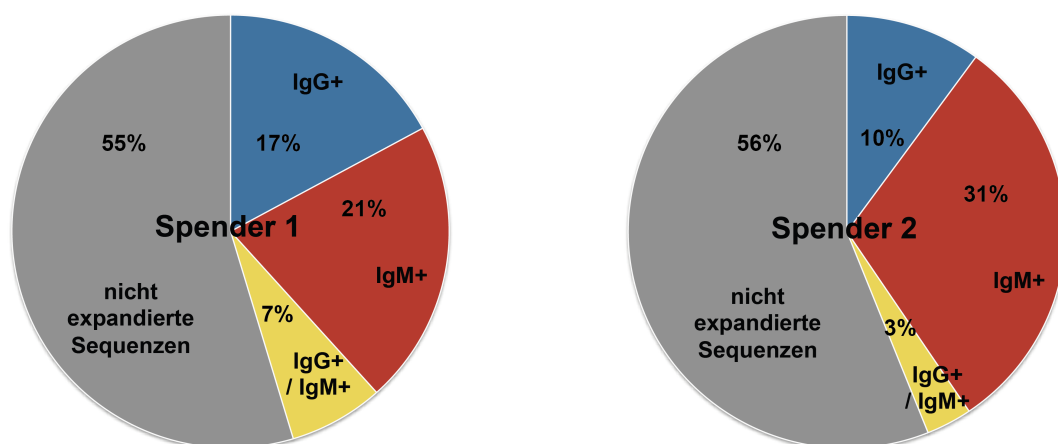


Abb.: 3.8 Verteilung der Sequenzen für Spender 1 und Spender 2. Grau: nicht-expandierte Klone bzw. einzelne Sequenzen; blau: Klone aus reinen IgG⁺-Sequenzen; rot: Klone aus reinen IgM⁺-Sequenzen gelb: Klone mit gemischten IgG⁺- und IgM⁺-Sequenzen. Anzahl aller Sequenzen: Spender 1 (66.652); Spender 2 (40.658)

In Tabelle 3.6 ist die Anzahl an Sequenzen einer Population an expandierten Klonen aufgetragen. Bei Spender 1 wurden 15% aller IgM⁺-Sequenzen Klonen mit IgG⁺- und IgM⁺-Mitgliedern zugeordnet, bei Spender 2 6% aller IgM⁺-Sequenzen.

Spender 1	IgG⁺ CD27⁻	IgG⁺ CD27⁺	IgM⁺IgD⁺ CD27⁺	IgM⁺only CD27⁺
Sequenzen einer Population	1.143	8.422	7.821	1.472
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺	780	1.046	-	-
IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	-	-	2.766	2.115
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	233	-	278	-
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	19	-	-	21
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	15	-	24	16
IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	-	852	829	-
IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	-	500	-	385
IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	-	333	456	350
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	71	135	78	-
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	4	6	-	4
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	11	13	30	10
Spender 2	IgG⁺ CD27⁻	IgG⁺ CD27⁺	IgM⁺IgD⁺ CD27⁺	IgM⁺only CD27⁺
Sequenzen einer Population	538	2.937	8.161	471
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺	288	322	-	-
IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	-	-	2.602	1.172
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	72	-	97	-
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	7	-	-	7
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	7	-	13	12
IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	-	288	406	-
IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	-	67	-	56
IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	-	59	131	56
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	17	25	34	-
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	1	4	-	1
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	2	3	8	3

Tab.: 3.6 Anzahl der Sequenzen an expandierten Klonen. Jede Reihe zeigt die B-Zell-Populationen und deren Sequenzanzahl die in den Klonen enthalten sind. Gesamte Anzahl expandierter Sequenzen: Spender 1 (30.238); Spender 2 (17.867)

Betrachtet man die Zusammensetzung der gefundenen Klone genauer, findet man jede mögliche Kombination der vier Gedächtnis-B-Zell-Populationen. In Tabelle 3.7 ist die Anzahl der Klone für jede dieser Kombinationen dargestellt. Abgesehen von Klonen mit Mitgliedern aus einer Gedächtnis-B-Zell-Population, bestanden 1.516 der Klone aus

Ergebnisse

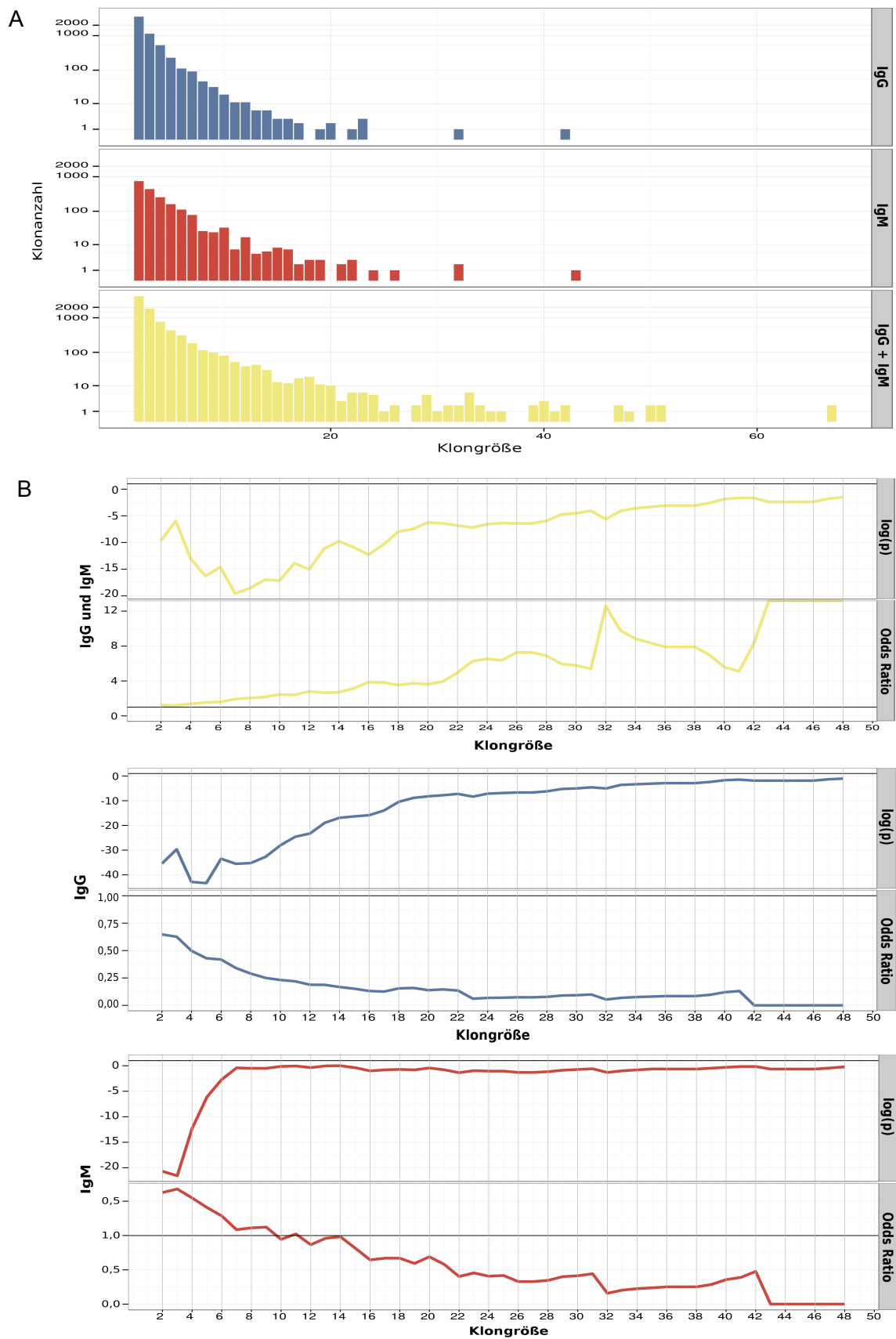
IgG⁺- und IgM⁺-Mitgliedern, 7.649 nur aus IgM⁺-Mitgliedern und 5.348 nur aus IgG⁺-Mitgliedern. Überraschenderweise wurden aus 500 ml humanem Blut mehr als 1.500 Klone mit IgG⁺- und IgM⁺-Mitgliedern detektiert.

	Spender 1	Spender 2	gesamt
IgG ⁺ CD27 ⁻	458	234	692
IgG ⁺ CD27 ⁺	2890	1059	3949
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺	487	220	707
IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	2616	2465	5081
IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	546	187	733
IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	1156	679	1835
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	183	66	249
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	16	5	21
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	11	5	16
IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	475	184	659
IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	241	44	285
IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	170	34	204
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺	51	16	67
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	4	1	5
IgG ⁺ CD27 ⁻ / IgG ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺ / IgM ⁺ onlyCD27 ⁺	8	2	10

Tab.: 3.7 Anzahl der gefundenen Klone (gesamt: 14513) kombiniert aus zwei Spendern. Aufgeteilt nach der Kombination von Mitgliedern der Gedächtnis-B-Zell-Populationen.

Als nächstes wurde die Klongröße reiner IgG⁺-Klone, reiner IgM⁺-Klone und gemischter Klone betrachtet. Zur vereinfachten Darstellung wurden beide Spender in den Grafiken zusammengefasst. Es sollte überprüft werden, ob die Zusammensetzung der Klone mit der Klongröße korreliert, d.h. ob es einfach mit der Anzahl der sequenzierten B-Zellen zusammenhing wie oft man gemischte Bäume mit IgM⁺- und IgG⁺-Mitgliedern finden würde. In Abbildung 3.9 A ist die Klongröße, d.h. die Anzahl der Sequenzen, die zu einem Klon gehören, im Verhältnis zur Gesamtmenge, d.h. die absolute Anzahl von Klonen gleicher Größe dargestellt. Wie zu erwarten sank die Anzahl der Klone im Verhältnis zur Klongröße. Es wurden viele kleine Klone und nur wenige große Klone detektiert. In der vorliegenden Analyse waren Klone mit mehr als 45 Mitgliedern ausschließlich vom Typ gemischt.

Eine wichtige Frage war, ob große Klone signifikant häufiger aus IgG⁺- und IgM⁺-Sequenzen bestehen. Dafür wurde die Odds Ratio, auch als Quotenverhältnis bezeichnet, berechnet. Die Odds Ratio ist ein Assoziationsmaß (statistisches Merkmal), das etwas



Ergebnisse

über die Stärke eines Zusammenhangs von zwei Merkmalen, in diesem Fall Klonkategorien, aussagt. In Abbildung 3.9 B ist die Odds Ratio und der dazugehörige $\log(p\text{-Wert})$ für die drei Klonkategorien aufgetragen. Das Quotenverhältnis von gemischten Klonen steigt kontinuierlich mit steigender Mitgliederzahl. Dagegen fällt das Quotenverhältnis von Klonen die nur IgG^+ - oder IgM^+ -Mitglieder enthalten mit der Klongröße. D.h., je größer ein Klon ist, desto wahrscheinlicher besteht er aus IgG^+ - und IgM^+ -Mitgliedern. Die Beziehung ist bereits ab einer Klongröße von 2 Mitgliedern signifikant. Eine Ausnahme bilden reine IgM^+ -Klone, bei ihnen ist diese Beziehung erst ab einer Klongröße von 10 Mitgliedern signifikant. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Klongröße durchweg signifikant mit dem Merkmal „gemischter Klon“ korrelierte. Von insgesamt 107.310 Sequenzen konnten 48.105 Sequenzen Klonen zugewiesen werden. Dabei wurden Klone mit jeder möglichen Kombination der vier sequenzierten Gedächtnis-B-Zell-Populationen gefunden. 15% bzw. 6% aller IgM^+ -Sequenzen wurden Klonen mit IgM^+ - und IgG^+ -Mitgliedern zugeordnet. Das zeigt, dass $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen gemeinsame Vorfahren mit klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen haben.

3.7 Genealogische Bäume von Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Genealogische Bäume zeigen die dynamische Entwicklung einer Immunantwort in Bezug auf Zeit, Diversität, Affinität, Selektion und klonale Komplexität der Expansion. Die genealogischen Bäume wurden mit IgTree[®] generiert (Barak et al., 2008). In Abbildung 3.10 sind exemplarisch Klone in einer Baumstruktur dargestellt. Bei Bäumen ausgegebenen von IgTree wandern die Zellen pro Mutation eine Ebene im Baum nach unten. Die Bäume wurzeln oben in der Keimbahn (*engl.: germline* = G.L.). Zur vereinfachten Darstellung wurden die exemplarischen Bäume abgezeichnet und die Anzahl der Mutationen neben den Ast geschrieben. Es wurden Klone gefunden, die aus $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen und $\text{IgM}^+\text{onlyCD27}^+$ B-Zellen bestehen (Abb.: 3.10 C; H). Bei diesen Bäumen konnte gezeigt werden, dass die $\text{IgM}^+\text{onlyCD27}^+$ B-Zellen im Durchschnitt in höheren Knotenpunkten auftraten. Reine IgM^+ -Bäume waren vorwiegend breite Klone, deren Mitglieder sich früh diversifizierten. Im Gegensatz dazu bestanden reine IgG^+ -Bäume (CD27^+ und CD27^-) aus weniger Mitgliedern und diversifizierten in Schnitt erst später, d.h. bei höheren Knotenpunkten (Abb.: 3.10 G; I). In Abbildung 3.10 E und F wurden Klone gezeigt, die aus Mitgliedern von $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen bestanden. Bei gemischten Klonen haben IgM^+ - und IgG^+ -

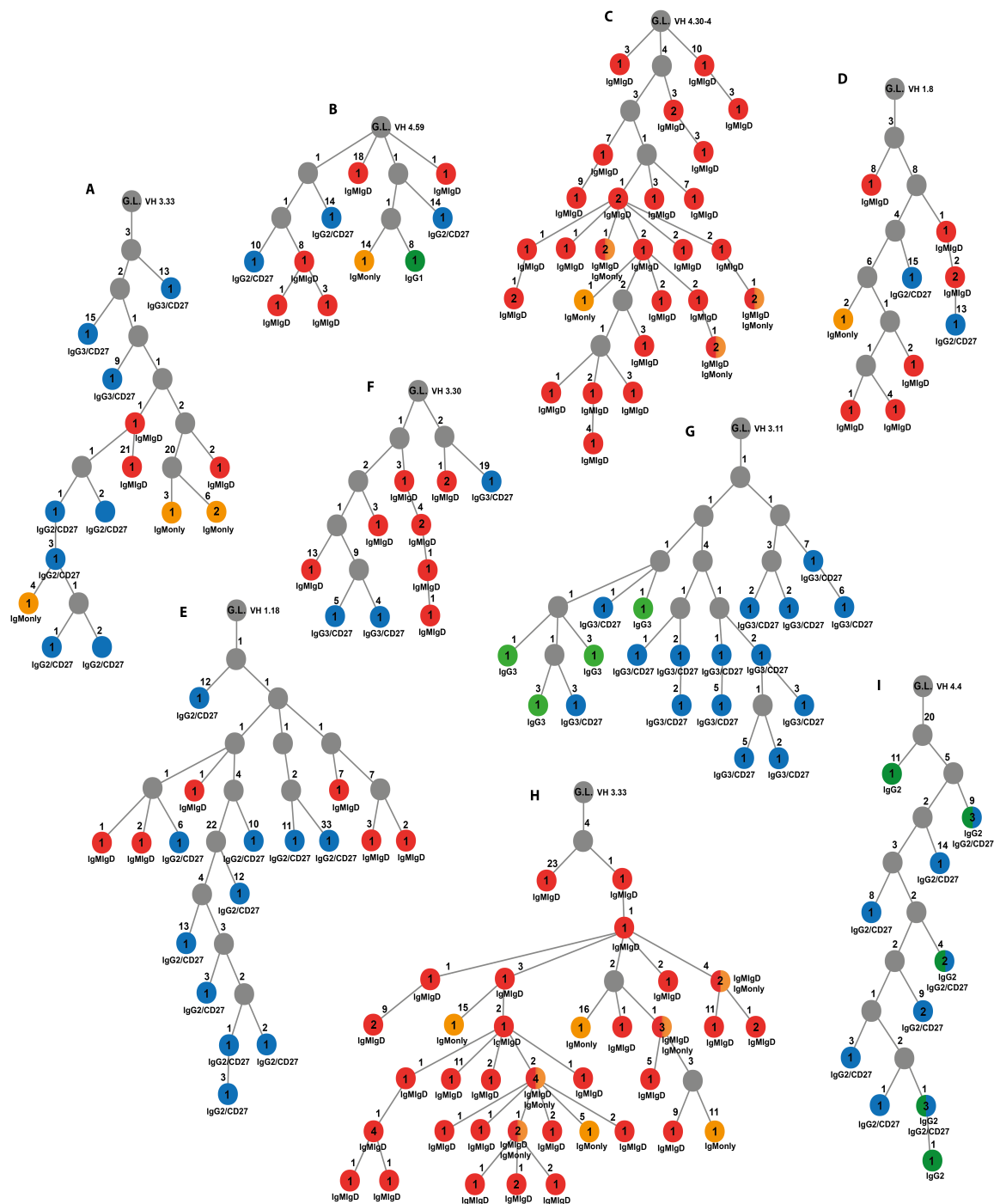


Abb.: 3.10 Mutationsbäume der Gedächtnis-B-Zell-Klone aus beiden Spendern. Die Zahlen in den Kreisen repräsentieren die Sequenzanzahlen. Zahlen an den Linien repräsentieren die Anzahl an zusätzlichen somatischen Mutationen zur Vorläuferzelle. Die Wurzel jedes Baumes beginnt mit der Keimbahnsequenz, mit „G.L.“ bezeichnet. rote Kreise: IgM/IgD CD27⁺ B-Zellen; orange Kreise: IgM⁺only CD27⁺ B-Zellen; grüne Kreise: IgG⁺CD27⁻ B-Zellen; blaue Kreise: IgG⁺ CD27⁺ B-Zellen; graue Kreise: hypothetische Zwischenglieder; zweifarbige Kreise: beide B-Zell-Populationen

Sequenzen sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Mutationen, wobei IgG⁺-Sequenzen mehr Mutationen trugen als IgM⁺-Sequenzen. In Abbildung 3.10 A und D wurden Klone abgebildet, die aus drei Gedächtnis-B-Zell-Populationen bestehen, IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen, IgM⁺onlyCD27⁺ B-Zellen und IgG⁺CD27⁺ B-Zellen. Es wurden

Ergebnisse

auch Klone gefunden, die aus allen vier sequenzierten Gedächtnis-B-Zell-Populationen bestehen (Abb.: 3.10 B). Die exemplarisch abgebildeten Bäume, die IgG^+ -Sequenzen enthielten, bestanden entweder nur aus einer IgG-Unterklasse (Abb.: 3.10 D; E; F; G; I) oder aus zwei verschiedenen IgG-Unterklassen (Abb.: 3.10 A; B).

Es wurden sich die größten Bäume ab einer Mitgliederzahl von 7 angesehen, dabei wurden Unterschiede in der Baumstruktur zwischen reinen IgG^+ - und IgM^+ -Bäumen gefunden. Reine IgG^+ -Bäume waren schlanker, d.h. ihre Äste (Mitglieder) verzweigten sich erst später im Baum und hatten viele gemeinsame Mutationen. Reine IgM^+ -Bäume waren breiter, d.h. ihre Äste (Mitglieder) spalteten sich schon früh im Baum auf und hatten meist keine oder vereinzelt gemeinsame Mutationen. Daher wurde die Struktur solcher Bäume genauer geprüft. In Abbildung 3.11 sind auf der X-Achse die Nukleotidaustausche innerhalb aller Mitglieder eines Klon (intraklonale Diversität) dargestellt; auf der Y-Achse ist die zeitliche Ebene im Baum abgebildet, bei der die früheste maximale Anzahl an Knoten (Baumbreite oder Diversität im Verhältnis zur Mutationslast) erreicht wurde. Es wurden Unterschiede in der intraklonalen Diversität und Baumbreite zwischen reinen IgG^+ -Bäumen, reinen IgM^+ -Bäumen und gemischten IgG^+ / IgM^+ -Bäumen detektiert. Mitglieder reiner IgM^+ -Bäume haben eine niedrigere Diversität als die reiner IgG^+ -Bäume. Die höchste intraklonale Diversität zeigen gemischte Klone. Zusammengefasst konnte

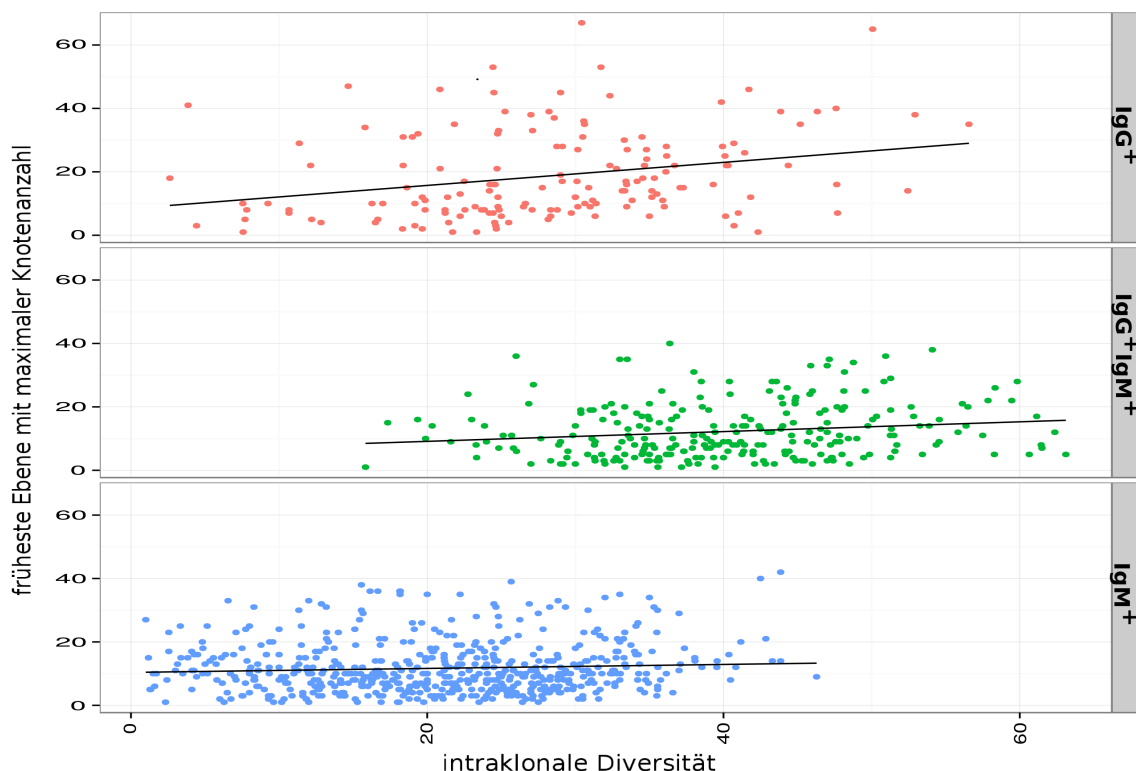


Abb.: 3.11 Klonale Baumstrukturen kombiniert aus zwei Spendern. Dargestellt ist die durchschnittliche Mutationsfrequenz zwischen den Mitgliedern eines Klon im Verhältnis zur ersten Ebene bei der die meisten Knoten vorliegen. In der Analyse sind Klone ab einer Mitgliederzahl von 7 enthalten.

festgestellt werden, dass bei IgG⁺-Bäumen im Vergleich zu reinen IgM⁺-Bäumen erstens die intraklonale Diversität höher ist und dass zweitens die Bäume später die erste Ebene mit maximaler Knotenanzahl erreichten, also eine stark selektionierte Struktur zeigten. IgM⁺-Bäume dagegen waren oftmals gedungen, d.h. früher und breiter verzweigt.

An genealogischen Bäumen mit IgG⁺-Mitgliedern war zu erkennen, dass sowohl Bäume mit nur einer IgG-Unterklasse (Abb.: 3.10 D; E; F; G; I) als auch mit zwei IgG-Unterklassen detektiert wurden (Abb.: 3.10 A; B). Somit ist nicht nur ein Klassenwechsel von IgM zu IgG sondern auch innerhalb der IgG-Unterklassen möglich. Daher wurde bestimmt, wie viele Klone aus der Kombination wie vieler IgG-Unterklassen bestehen (Abb.: 3.12). Betrachtet man die Verteilung der Kombinationen, so bestanden die meisten Klone aus nur einer IgG-Unterklasse, wenige aus zwei IgG-Unterklassen und nur sehr wenige aus drei IgG-Unterklassen. Die Kombination von vier IgG-Unterklassen in einem Klon wurde nicht gefunden.

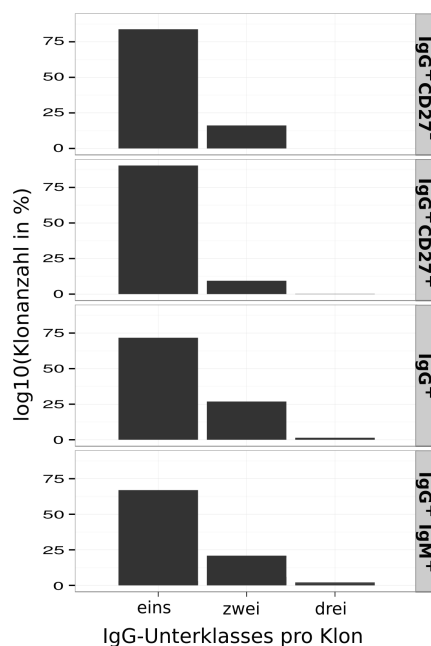


Abb.: 3.12 Anzahl der IgG-Unterklassen pro Klon: Anzahl der IgG-Unterklassen dargestellt als Anzahl der Klone, kombiniert aus zwei Spendern. Links ist der Namen der Populationen aufgetragen. Anzahl der Klone mit einer IgG-Unterklasse: IgG⁺CD27⁻(377); IgG⁺CD27⁺(2601); IgG⁺(344); IgG⁺IgM⁺(1041). Anzahl der Klone mit zwei IgG-Unterklassen: IgG⁺CD27⁻(81); IgG⁺CD27⁺(283); IgG⁺(133); IgG⁺IgM⁺(108). Anzahl der Klone mit drei IgG-Unterklassen: IgG⁺CD27⁻(6) IgG⁺(10) IgG⁺IgM⁺(10)

Die hohe Anzahl klonal verwandter Sequenzen zwischen IgM⁺IgD⁺CD27⁺ und IgG⁺CD27⁺ und die Tatsache, dass eine signifikante Korrelation von Klongröße und dem Merkmal „gemischter Klon“ bestand zeigen, dass sowohl IgM⁺ B-Zellen als auch IgG⁺ B-Zellen in einer gemeinsamen Keimzentrumsreaktion gebildet werden können. Das untermauert weiter die frühere Hypothese (Seifert & Küppers, 2009), dass ein Großteil der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen Gedächtnis-B-Zellen sind und aus einer gemeinsamen Keimzentrumsreaktion stammen.

3.8 Die IgG-Unterklassenverwendung der Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Verwendung der IgG-Unterklassen bei den beiden IgG^+ Gedächtnis-B-Zell-Populationen behandelt, unter dem Aspekt ihrer Verwandtschaft. Die humane Immunglobulin Klasse (Isotyp) IgG lässt sich in vier IgG-Unterklassen (IgG1-4) unterteilen. Anhand der Sequenz der konstanten Region ist es möglich, die verwendete IgG-Unterklasse und somit die Verteilung der IgG-Unterklassen bei den Gedächtnis-B-Zell-Populationen zu ermitteln. Die Verteilung der IgG-Unterklassen variierte zwischen den beiden Spendern und den beiden IgG^+ B-Zell-Populationen. Bei der $\text{IgG}^+\text{CD}27^-$ B-Zell-Population dominierte IgG3, bei der $\text{IgG}^+\text{CD}27^+$ B-Zell-Population dominierte IgG2. Ein weiterer Unterschied konnte zwischen den Spendern detektiert werden, bei Spender 2 wurde im Vergleich zu Spender 1 IgG4 gefunden (Abb.: 3.13). Zusammenfassend konnte eine konsistent unterschiedliche Nutzung der IgG-Unterklassen zwischen der $\text{IgG}^+\text{CD}27^-$ und $\text{IgG}^+\text{CD}27^+$ B-Zell-Population gezeigt werden.

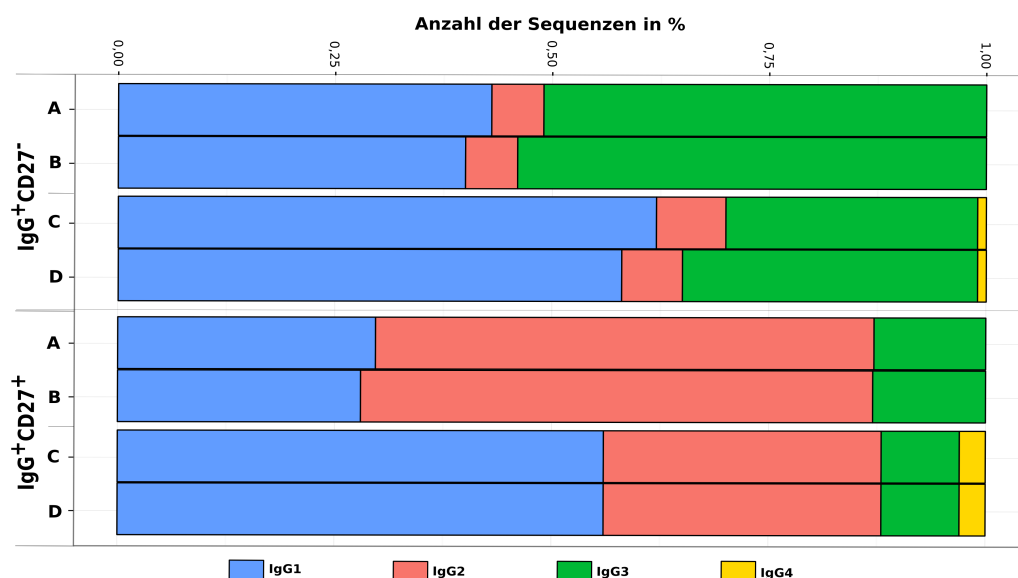
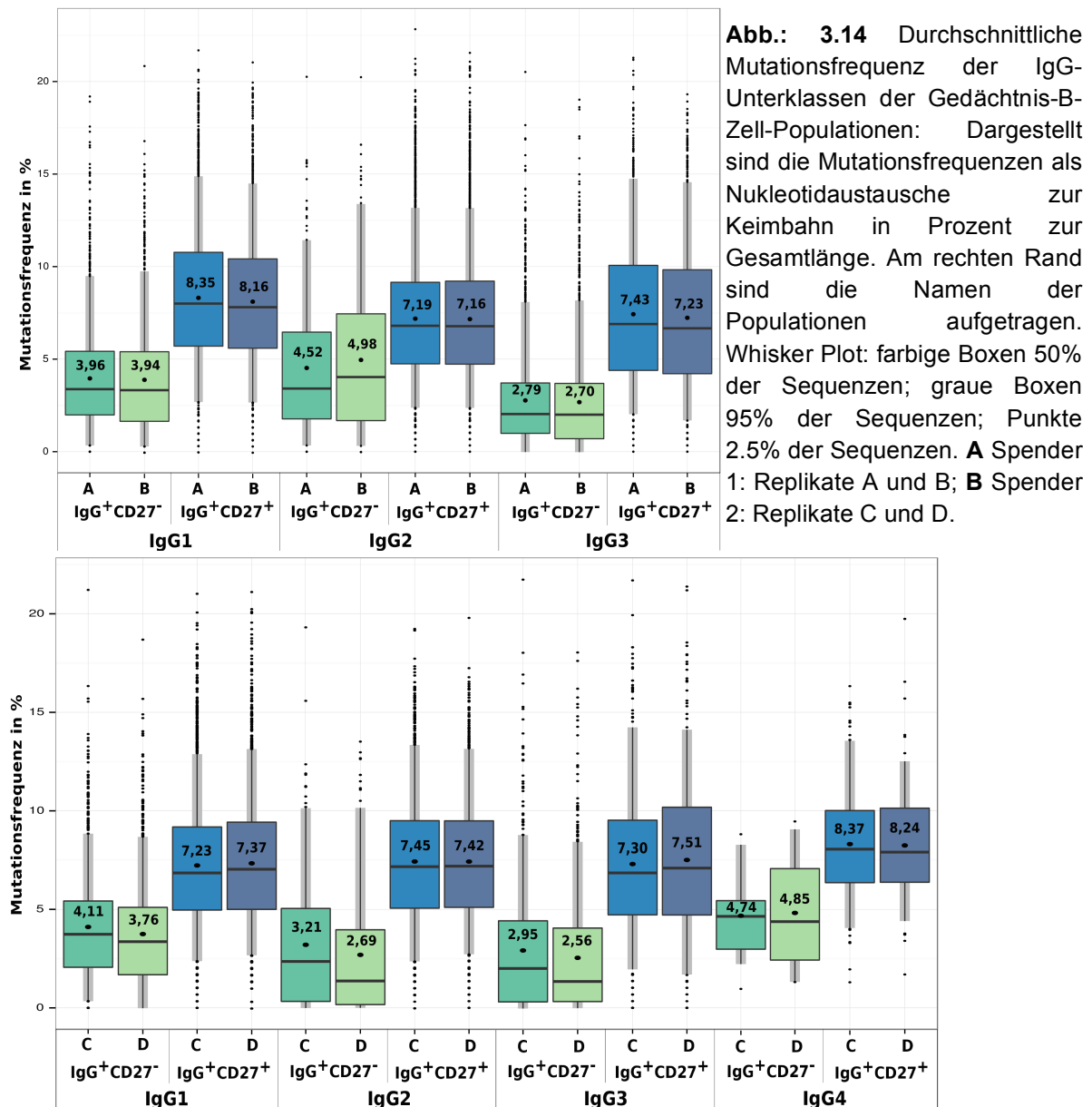


Abb.: 3.13 Verteilung der IgG-Unterklassen: Anzahl der Sequenzen der IgG-Unterklassen dargestellt als Prozentanteil der Gesamtanzahl. Links stehen die Namen der Populationen. Anzahl der Sequenzen $\text{IgG}^+\text{CD}27^-$ A(4.766), B(3.992), C(2.372) D(2.584); $\text{IgG}^+\text{CD}27^+$ A(12.121), B(9.497), C(6.138), D(4.637) Spender 1: Replikate A und B; Spender 2: Replikate C und D.

Die durchschnittliche Mutationsfrequenz der einzelnen IgG-Unterklassen ist konsistent für Spender und Replikate. Die einzigen Unterschiede wurden zwischen den IgG-Unterklassen detektiert (Abb.: 3.14). Wie auch schon bei der Gesamtpopulation waren auch die Mutationsfrequenzen der IgG-Unterklassen höher bei $\text{IgG}^+\text{CD}27^+$ als bei $\text{IgG}^+\text{CD}27^-$ B-Zellen. Bei der $\text{IgG}^+\text{CD}27^-$ B-Zell-Population konnten die meisten unmutierten B-Zellen detektiert werden. Unterschiede zwischen den Spendern wurde nur

bei der IgG2-Unterklasse der IgG⁺CD27⁻ Population gefunden: Spender 1 hatte eine höhere durchschnittliche Mutationsfrequenz als Spender 2. Die Mutationsfrequenz der IgG4-Unterklasse war höher als die aller anderen IgG-Unterklassen, konnte jedoch nur für Spender 2 bestimmt werden.



Auch bei den Mutationsfrequenzen der IgG-Unterklassen wurde überprüft, ob diese aus einer oder zwei Populationen, also möglicherweise aus einer niedrig bzw. unmutierten und einer höher mutierten Population bestehen. Wie in Abbildung 3.15 zu sehen zeigten alle Populationen der IgG-Unterklassen eine weitestgehend homogene Kurve, die ihren höchsten Punkt bei der durchschnittlichen Mutationsfrequenz der jeweiligen IgG-Unterklasse hatte. Da jedoch große *Bins* gewählt wurden, könnten Populationen mit nahe beieinander liegenden Mittelwerten nicht erkannt werden.

Ergebnisse

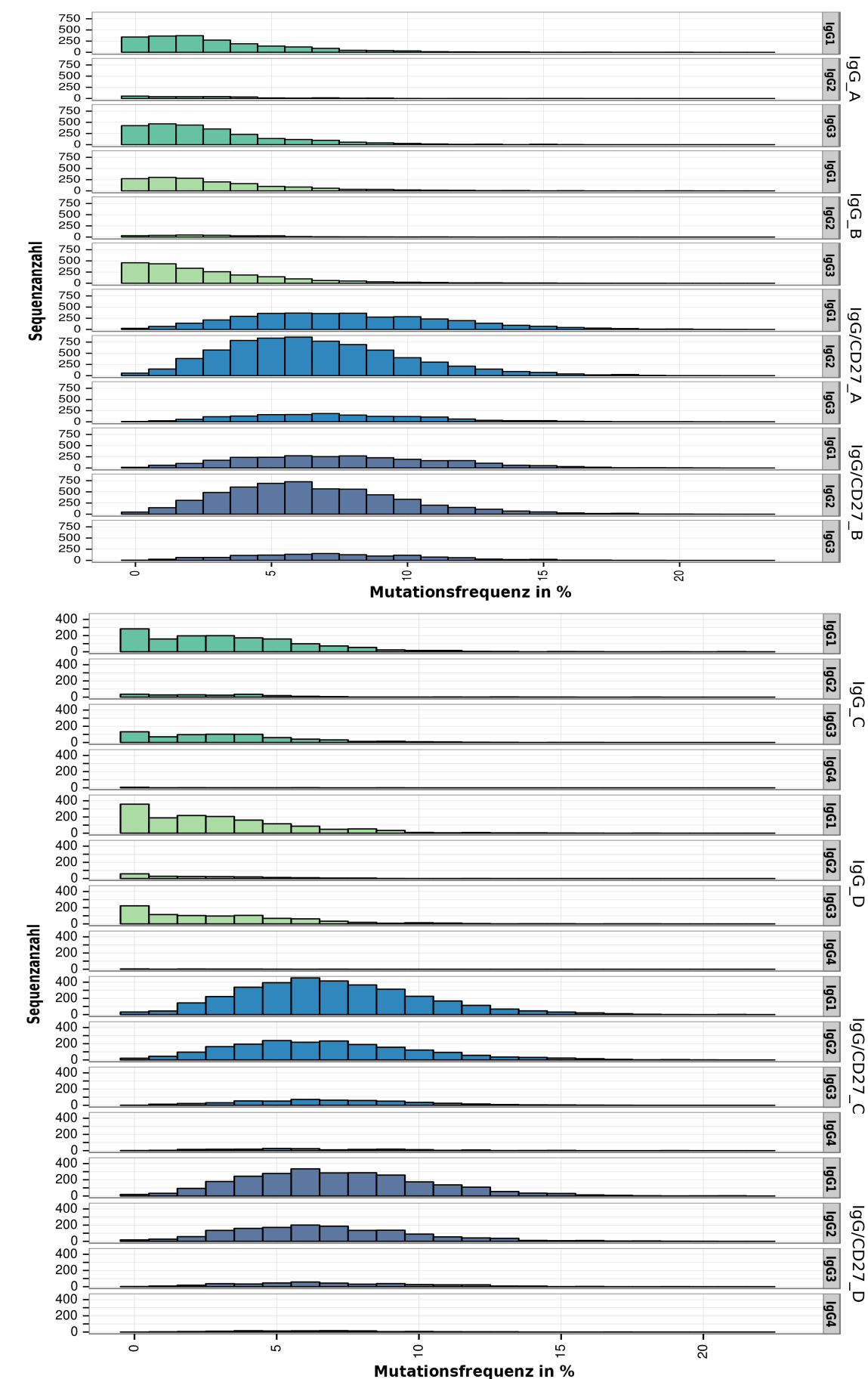


Abb.: 3.15 Mutationsverteilung der IgG-Unterklassen: Dargestellt als prozentuale Mutationsfrequenz aufgetragen zur Sequenzanzahl. Am rechten Rand sind die Namen der Populationen aufgetragen. **A** Spender 1: Replikate A und B; **B** Spender 2: Replikate C und D.

Da bei der IgG3⁺CD27⁻ B-Zell-Population die meisten unmutierten Sequenzen detektiert wurden, wurde sich in Abbildung 3.16 die Verteilung der IgG-Unterklassen für unmutierte Sequenzen der IgG⁺CD27⁻ B-Zell-Population genauer angesehen. Die unterschiedliche Verwendung der IgG-Unterklassen bei der CD27-negativen Population zeigt, dass diese möglicherweise aus unterschiedlichen Immunreaktionen stammen, was die Unterschiede in ihren durchschnittlichen Mutationsfrequenzen unterstützt.

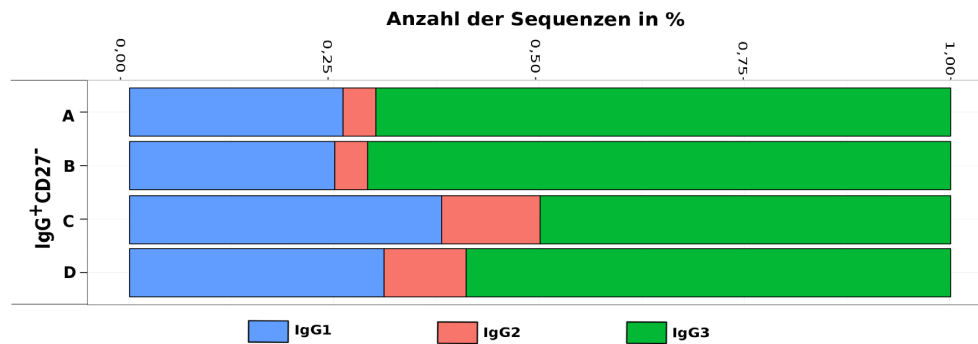


Abb.: 3.16 Verteilung der IgG-Unterklassen der unmutierten IgG⁺CD27⁻ B-Zell-Population: Anzahl der Sequenzen der IgG-Unterklassen, dargestellt als Prozentanteil der Gesamtanzahl mit mindestens 99% Identität zur Keimbahn. Anzahl an Sequenzen Spender 1: Replikat A IgG1(216); IgG2(33); IgG3(575); und Replikat B IgG1(189); IgG2(31); IgG3(547); Spender 2: Replikat C IgG1(82); IgG2(26); IgG3(106); und Replikat D IgG1(92); IgG2(30); IgG3(173).

Im folgenden Abschnitt wird auf die IgG-Unterklassen expandierter Klone genauer eingegangen. Hierzu wurden entweder Klone, die aus Mitgliedern verschiedener Gedächtnis-B-Zell-Populationen bestanden mit Klonen, die aus Mitgliedern einer Gedächtnis-B-Zell-Population bestanden verglichen. In diesem Zusammenhang wurde die Verwendung der IgG-Unterklassen beider Gruppen näher bestimmt. Stammen die Sequenzen aus Klonen mit Mitgliedern aus verschiedener Gedächtnis-B-Zell-Populationen (Abb.: 3.17 A), so ist deren Mutationsfrequenz über alle IgG-Unterklassen ähnlicher, als wenn die Sequenzen aus Klonen mit Mitgliedern nur einer Gedächtnis-B-Zell-Populationen stammten (Abb.: 3.17 B). Es zeigten sich Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Mutationsfrequenzen reiner IgG⁺CD27⁻ Klone und reiner IgG⁺CD27⁺ Klone: die durchschnittliche Mutationsfrequenz der IgG⁺CD27⁻ B-Zellen war niedriger als die der IgG⁺CD27⁺ B-Zellen. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass sich die Mutationsfrequenz bei Klonen mit IgG⁺CD27⁻ und IgG⁺CD27⁺-Mitgliedern zwischen diesen beiden Gedächtnis-B-Zell-Populationen weniger stark unterscheidet als bei Klonen mit Mitgliedern nur einer dieser Gedächtnis-B-Zell-Populationen, was möglicherweise ein Hinweis dafür ist, dass B-Zellen reiner IgG⁺CD27⁻ Klone aus unterschiedlichen Immunreaktionen als IgG⁺CD27⁺ B-Zellen stammen könnten.

Ergebnisse

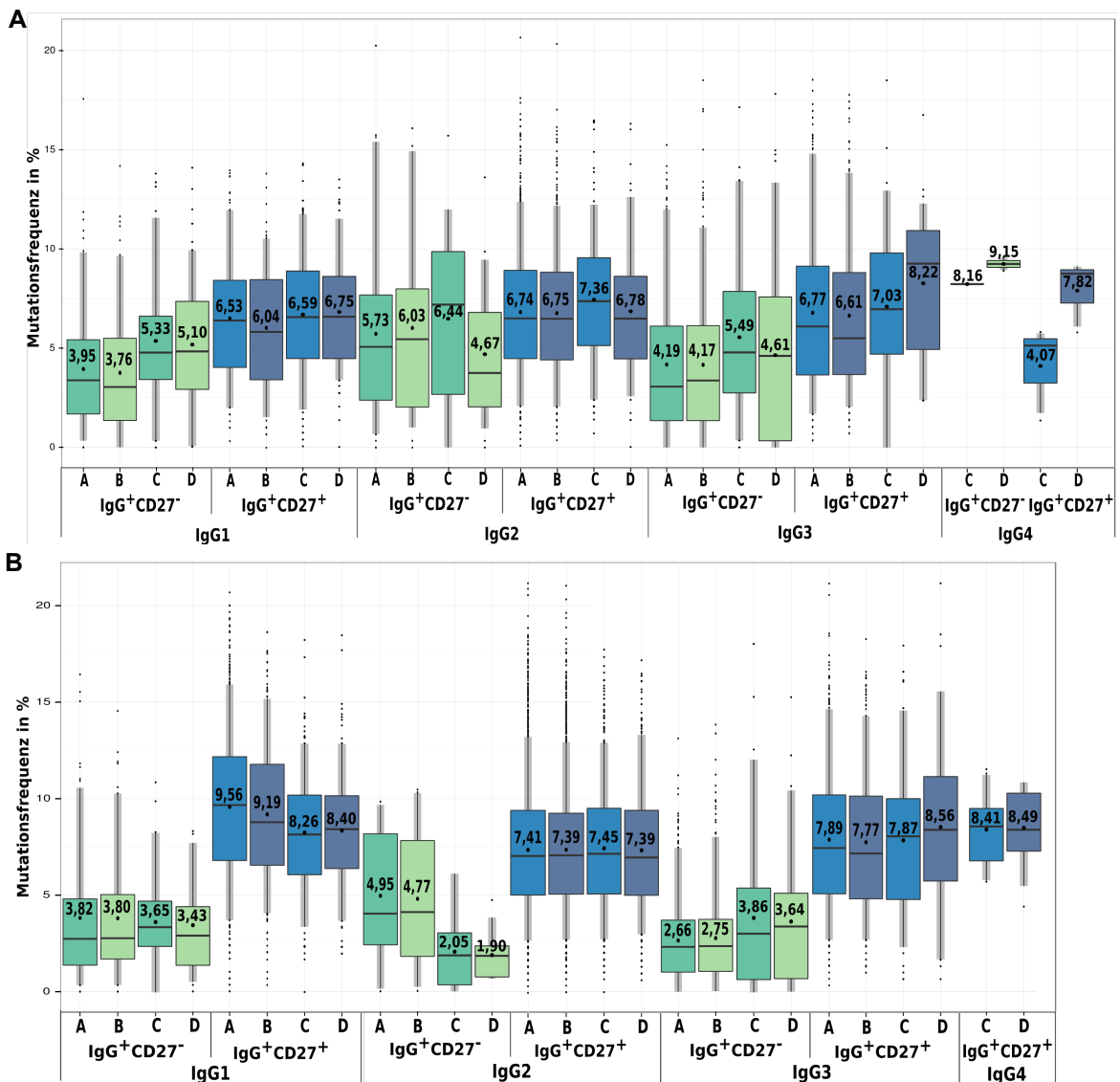


Abb.: 3.16 Mutationsfrequenz der IgG-Unterklassen: Dargestellt ist die Mutationsfrequenzen als Nukleotidaustausche zur Keimbahn in Prozent zur Gesamtlänge. Unten sind die Namen der Populationen aufgetragen. **A** Klone mit Mitgliedern verschiedener Gedächtnis-B-Zell-Populationen. **B** Klone mit Mitgliedern nur einer Gedächtnis-B-Zell-Populationen.

Sowohl die Verwendung der IgG-Unterklassen als auch die Mutationsfrequenz unterschied sich zwischen IgG⁺CD27⁻ und IgG⁺CD27⁺ B-Zellen. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass ein Teil der IgG⁺CD27⁻ und IgG⁺CD27⁺ B-Zellen aus derselben Immunreaktion stammen können, da bei gemeinsamen Klonen deren Mutationsfrequenz ähnlicher war als wenn nur IgG⁺CD27⁻ B-Zellen in einem Klon gefunden wurden. Die Population der IgG⁺CD27⁻ B-Zellen wies die meisten unmutierten Sequenzen auf, mit IgG3 als häufigstem Isotyp. Gerade Klone mit nur IgG⁺CD27⁻ B-Zellen wiesen eine unterschiedliche durchschnittliche Mutationsfrequenzen zu gemischten Klonen oder IgG⁺CD27⁺ B-Zell-Klonen auf. Das lässt vermuten, dass dieser Anteil der IgG⁺CD27⁻ B-Zellen möglicherweise nicht aus einer gemeinsamen Immunantwort mit IgG⁺CD27⁺ B-Zellen abstammt.

DISKUSSION

Um die Komposition und Komplexität humaner Gedächtnis-B-Zell-Population im Allgemeinen und den kontrovers diskutierten Ursprung somatisch mutierter $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen im Menschen aufzudecken und die Verwandtschaft von $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ zu anderen Gedächtnis-B-Zell-Populationen zu klären, wurden die V_H -Gene von zwei Spendern analysiert. Dazu wurde pro Spender aus 500ml Vollblut jeweils zwei Replikate der $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$, $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$, $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgM}^+\text{onlyCD27}^+$ B-Zell-Populationen durch FACS-Sortierung mit insgesamt 220.000 Zellen gewonnen. Die V_H -Gene wurden durch Massiv-Parallel-Sequenzierung mit 2.000.000 Reads pro Spender ausgelesen.

Es gibt bereits publizierte Arbeiten in denen die V-Gene humaner B-Zellen durch Massiv-Parallel-Sequenzierung analysiert wurden. In einer frühen Arbeit wurden alle B-Zellen verwendet, die V-,D-, und J- Gen-Nutzung und die CDRIII-Länge untersucht und alle gefundenen Reads wurden verwendet (Arnaout et al., 2011). Eine andere Arbeit analysierte zwar die V-,D-, und J-Gen-Nutzung und die CDRIII-Länge von naiven, IgM^+ und IgG^+ Gedächtnis-B-Zellen, allerdings wurde keine bestimmte Zellzahl sortiert sondern nur 100ng RNA pro Population ausgelesen (Briney et al., 2012). Bei einer neueren Arbeit wurden verschiedene Gedächtnis-B-Zell-Populationen sortiert und Einzel-Sequenzen wurden vor der Analyse entfernt, jedoch wurde nur deren V-,D-, und J- Gen-Nutzung und die CDRIII-Länge untersucht (Mroczek et al., 2014).

Die vorliegende Arbeit ist die erste Arbeit bei der die Gedächtnis-B-Zell-Population mit genauer Zellzahl in zwei Replikaten sortiert wurden. Für die Analyse wurden nur Sequenzen verwendet, die mindestens zweimal gefunden wurden.

4.1 V_H -Gen Analyse von Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Als erstes wurde die V_H -Gen-Nutzung der vier Gedächtnis-B-Zell-Populationen verglichen. Die Verwendung der V_H -Gene zwischen den vier Gedächtnis-B-Zell-Populationen war weitgehend gleichmäßig verteilt. In der vorliegenden Arbeit wurden pro Gedächtnis-B-Zell-Population zwei Replikate verwendet, diese konnten als Qualitätskontrolle für Zellsortierung und PCR verwendet werden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu anderen Massiv-Parallelen-Sequenzierungen von V_H -Genen (Wu et al., 2010, Wu et al., 2011) in denen Unterschiede in der V_H -Gen-Nutzung zwischen IgM^+ - und klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen gefunden wurden. Die Daten in diesen beiden

Diskussion

Arbeiten basieren auf sortierten B-Zellen aus 50 ml Vollblut. Es wurden zwar 3 bzw. 9 Spender analysiert jedoch war die Anzahl der analysierten Sequenzen sehr gering. Auch wurde unzureichend beschrieben, wie mit den Sequenzen während der bioinformatischen Auswertung verfahren wurde und ob die p-Werte für multiples Testen angepasst wurden. Es ist also nicht klar, ob in die Auswertung der klonalen Verwandtschaft nur Sequenzen kamen, die zweimal und mehr gefunden wurden oder ob alle sequenzierten Sequenzen verwendet wurden. In der vorliegenden Arbeit ist die Komplexität und die Anzahl an Sequenzen wesentlich größer. Sowohl die Ähnlichkeit der beiden Replikate als auch die gleichmäßige Verwendung der V_H -Gene bei allen vier Gedächtnis-B-Zell-Populationen konnte als Qualitätskontrolle für die Aufarbeitung der Proben und die Sequenzierung verwendet werden. Des Weiteren zeigt die überwiegend gleichmäßige Verwendung der V_H -Gene zwischen den Gedächtnis-B-Zell-Populationen, dass diese einem weitgehend ähnlichen Selektionsdruck unterlagen und somit aus verwandten Immunantworten stammen.

Die CDRIII-Länge der Gedächtnis-B-Zell-Populationen ist ein Maß für die Komplexität. Die Homogenität einer Population, spiegelt aber auch selektive Prozesse wider. Dies reflektiert z.B. die Gegenselektion besonders langer, autoreaktiver CDRIII. Die CDRIII-Längen aller vier Gedächtnis-B-Zell-Populationen zeigten eine homogene Verteilung mit ähnlichem Mean. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in früheren Arbeiten (Wu et al., 2010) gefunden, in denen zusätzlich die CDRIII-Länge von naiven B-Zellen analysiert wurde; diese war signifikant größer als die von klassengewechselten B-Zellen oder $IgM^+IgD^+CD27^+$ Gedächtnis-B-Zellen. In diesen Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass die kürzere CDRIII-Länge der Gedächtnis-B-Zell-Populationen mit einer Bevorzugung eines IGHJ-Gens zusammenhing. Ebenfalls in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche CDRIII-Länge der IgG^+CD27^- B-Zell-Population größer ist als die der $CD27^+$ Gedächtnis-B-Zell-Populationen (Wu et al., 2011). Da alle vier Gedächtnis-B-Zell-Populationen eine ähnliche, gleichförmige Verteilung ihrer CDRIII-Längen aufweisen, ist davon auszugehen, dass alle Populationen an ähnlichen Immunreaktionen teilgenommen haben und da der Vergleich mit nicht selektionierten naiven B-Zellen zeigt, dass diese im Vergleich zu Gedächtnis-B-Zell-Populationen eine signifikant längere CDRIII haben, ist davon auszugehen, dass alle vier in dieser Arbeit analysierten B-Zell-Populationen unter ähnlichem Selektionsdruck gestanden haben.

Das Durchlaufen einer Keimzentrumreaktion geschieht nicht ohne Spuren, diese zeigen sich durch somatische Mutationen zu einem Großteil in den V-Genen. Aber auch andere transkriptionsaktive Gene sind betroffen z.B. *BCL6*, jedoch mit niedrigerem Mutationslevel. In der vorliegenden Arbeit unterschied sich die durchschnittliche Mutationsfrequenz der V_H -Gene zwischen den Gedächtnis-B-Zell-Populationen, war jedoch sowohl zwischen den Spendern als auch den Replikaten beinahe identisch. Die analysierten Populationen zeigten eine zufällig verteilte Mutationslast, die sich dennoch in ihrem Mittelwert unterschieden. Wie schon frühere Arbeiten gezeigt haben, ist die durchschnittliche Mutationsfrequenz der IgG^+CD27^+ B-Zell-Population um 50% höher als die der $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zell-Population (Klein et al., 1998b, Seifert & Küppers, 2009, Wu et al., 2011). Des Weiteren wurde festgestellt, dass die durchschnittliche Mutationsfrequenz der $IgM^+onlyCD27^+$ B-Zell-Population zwischen der der IgG^+CD27^+ B-Zell-Population und der $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zell-Population lag (Klein et al., 1998b, Wu et al., 2011). Sowohl in früheren Arbeiten als auch in der vorliegenden Arbeit wurden somatische Mutationen in den V_H -Genen bei $IgM^+IgD^+CD27^+$ und IgM -only B-Zell-Populationen gefunden, was ein weiteres, starkes Argument dafür ist, dass ein Großteil dieser B-Zellen aus Keimzentumsreaktionen mit klassengewechselten Gedächtnis-B-Zellen abstammten (Seifert & Küppers, 2009). Ebenfalls in früheren Arbeiten und der vorliegenden Arbeit wurde eine unterschiedliche durchschnittliche Mutationsfrequenz der beiden IgG^+ B-Zell-Populationen detektiert; die durchschnittliche Mutationsfrequenz der IgG^+CD27^- B-Zell-Population betrug 50% bis 60% der Mutationsfrequenz der IgG^+CD27^+ B-Zell-Population (Fecteau et al., 2006, Wu et al., 2011). Die konstanten Werte der Mutationsfrequenz zwischen den Replikaten in der vorliegenden Arbeit und im Vergleich zu früheren Arbeiten konnte als Qualitätskontrolle für die Aufarbeitung der Proben und die Sequenzierung verwendet werden. Die ähnliche durchschnittliche Mutationsfrequenz und gleichmäßige Verteilung der Mutationen zwischen den Replikaten zeigt die Homogenität dieser B-Zell-Populationen und bedingen einen Vorteil für die statistische Auswertung. Die Unterschiede in der Mutationsfrequenz lassen vermuten, dass dies etwas über die Aufenthaltsdauer im Keimzentrum aussagt, wenn sowohl der Prozess der somatischen Hypermutation zeitlich gleichmäßig abläuft und auch die Zellteilungsrate gleichbleibend ist. Die durchschnittlich niedrigere Mutationsfrequenz der $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zell-Population in Vergleich zur IgG^+CD27^+ B-Zell-Population könnte eine kürzere Aufenthaltsdauer im Keimzentrum vermuten lassen. Die $IgM^+onlyCD27^+$ B-Zell-Population hatte eine durchschnittlich höhere Mutationsfrequenz als die $IgM^+IgD^+CD27^+$ B-Zell-Population, was einen längeren Aufenthalt im Keimzentrum bedeuten könnte. Die

Diskussion

Mutationsfrequenzen der IgG⁺CD27⁻ und der IgG⁺CD27⁺ B-Zell-Populationen wird in Kapitel 4.3 genauer analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden weder die von den Gedächtnis-B-Zell-Populationen produzierten Antikörper isoliert noch sind die Antigene, die von den B-Zell-Populationen erkannt werden bekannt. Da die FR wichtig für die Funktion, Form und Stabilität des Antikörpers sind und daher Aminosäureaustauschmutationen meistens eine Veränderung der Antikörperform zur Folge haben, sollten solche Mutationen gegenselektioniert werden. Ein K_a/K_s -Wert von <1 bedeutet, dass mehr stille Mutationen als Aminosäureaustauschmutationen in den FR gefunden wurden, was man bei Selektion in einer Keimzentrumsreaktion erwarten würde. Alle analysierten Gedächtnis-B-Zell-Populationen haben ähnliche durchschnittliche K_a/K_s -Werte zwischen 0,90 und 0,96. Ähnliche Ergebnisse haben frühere Arbeiten gezeigt, bei den die durchschnittlichen R/S-Werte der FR von Gedächtnis-B-Zell-Populationen analysiert wurden und deren Werte zwischen 1,0 und 1,6 lagen (Klein et al., 1998a). Diese Ergebnisse zeigen, dass die vier analysierten Gedächtnis-B-Zell-Populationen unter Selektion auf Ausprägung des BCR gestanden haben. Da zumindest die IgG⁺CD27⁺ B-Zell-Populationen post-Keimzentrums-B-Zellen sind und die K_a/K_s -Werte bei allen vier analysierten B-Zell-Populationen ähnlich waren, könnte Affinitätsreifung stattgefunden haben.

4.2 Klonale Verwandtschaft von Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Von zwei Spendern wurden zusammen aus 440.000 sortierten Gedächtnis-B-Zellen insgesamt 107.310 Sequenzen gewonnen, von denen 48.105 Sequenzen Klonen zugewiesen werden konnten. Somit waren 45% aller analysierten Sequenzen klonal expandiert. Es wurden Klone mit jeder möglichen Kombination der vier sequenzierten Gedächtnis-B-Zell-Populationen gefunden. Überraschenderweise wurden aus 500 ml humanem Blut mehr als 1500 Klone mit IgG⁺- und IgM⁺-Mitgliedern gefunden. 15% bei Spender 1 und 6% bei Spender 2 aller IgM⁺-Sequenzen wurden Klonen mit IgG⁺- und IgM⁺-Mitgliedern zugeordnet. Es wurde auch die Zusammensetzung der Klone in Verbindung mit der Klongröße betrachtet. Dabei zeigte sich, dass die Klongröße durchweg signifikant mit Klonen aus IgG⁺- und IgM⁺-Mitgliedern korrelierte, das heißt je größer ein Klon war desto wahrscheinlicher war dieser auch gemischt. Die gefundenen Klone wurden durch die Darstellung als genealogische Bäume genauer betrachtet. Große Klone waren zwar häufig gemischt, es wurden aber auch Klone mit nur IgG⁺- oder nur

IgM⁺-Mitgliedern gefunden. Genealogische Bäume mit IgG⁺-Mitgliedern zeigten im Schnitt eine schlankere, stark selektionierte Struktur. Bei einigen dieser IgG⁺-Bäume hatten ihre Mitglieder viele gemeinsame Mutationen. Diese Klone könnten aus einer sekundären Immunantwort stammen, bei der eine klassengewechselte Gedächtnis-B-Zelle bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen wieder in ein Keimzentrum einwandert und als Vorfahre aller Mitglieder des Klons dient. IgM⁺-Bäume dagegen waren oftmals gedrungener, d.h. früher und breiter verzweigt und hatten daher vermutlich eine weniger lange Aufenthaltsdauer im Keimzentrum, da sie keine bis wenige Substitutionsunterschiede zur Keimbahnsequenz hatten. Mutationsbäume mit IgG⁺- und IgM⁺-Mitgliedern zeigten die dynamische Entwicklung einer Immunantwort, bei der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen früher ein gemeinsames Keimzentrum verlassen haben als ihre IgG⁺CD27⁺ oder IgM⁺onlyCD27⁺ Verwandten.

Die Herkunft und Funktion der IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zell-Population wird kontrovers diskutiert. Es gibt derzeit drei unterschiedliche Thesen in der Literatur über den Ursprung dieser B-Zellen:

A) In Patienten mit Hyper-IgM-Syndrom wurden keine Keimzentren, keine IgM⁺onlyCD27⁺ B-Zellen, keine klassengewechselten B-Zellen aber mutierte IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen gefunden (Agematsu et al., 1998, Weller et al., 2001, Weller et al., 2004). Deshalb gehen die Autoren davon aus, dass diese mutierten IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen unabhängig von einer Keimzentrumsreaktion generiert werden und folglich keine Gedächtnis-B-Zellen sind. Das führte zu der Vermutung, dass die IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen ihre V-Gene ähnlich denen in Schafen und Hasen bereits in der primären Diversifizierung mutieren (Weill et al., 2004) und dieser Prozess vermutlich in der Marginalzone der Milz stattfindet (Weller et al., 2001, Weller et al., 2004, Weill et al., 2004).

B) Nach dem Verlust der Milz besaßen asplenische Menschen kaum noch mutierte IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen, waren anfällig für Infektionen mit Erregern aus dem Blut und hatten eine schlechte Immunantwort gegen Polysaccharid-Antigene. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Kleinkindern jünger als 2 Jahre, bei denen sich noch keine Marginalzone ausgebildet hat. Kleinkinder sind anfällig für Infektionen mit bekapselte Bakterien und Erregern aus dem Blut. Weiterhin ist eine Immunantwort gegen Polysaccharide nur sehr schwach vorhanden (Kruetzmann et al., 2003, Weller et al., 2004, Weller et al., 2005, Weller et al., 2008). Daher wird von den Autoren vermutet, dass diese IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen sowohl im Blut als auch in der Milz wichtig sind bei Immunantworten gegen TI-Antigene z.B. bei einer Vakzinierung gegen nicht-konjugierte Pneumokokken und in solchen Immunantworten als keimzentrumsunabhängige und TI-Gedächtnis-B-Zellen

Diskussion

gebildet werden. Des Weiteren würden $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen aus dem peripheren Blut das zirkulierende Äquivalent der Milz Marginalzonen-B-Zellen darstellen und nur an Immunantworten gegen TI-Antigene teilnehmen (Weller et al., 2004).

C) $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen tragen wie $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen Spuren einer Keimzentrumerfahrung. Zum einen haben ihre V-Gene somatische Mutationen (Klein et al., 1998b). Zum anderen haben $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen Merkmale von Selektion und Affinitätsreifung, wie ähnliche R/S-Werte (Klein et al., 1998a) und ähnliche durchschnittliche CDRIII Längen (Wu et al., 2010). In Mutationsanalysen von *BCL6* an sortierten Gedächtnis-B-Zell-Populationen (Seifert & Küppers, 2009) konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen keimzentrumserfahren sind, da sie Mutationen im *BCL6* tragen. Weiterhin wurden in diesen Studien durch V-Gen PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung gemeinsame Klone mit IgM^+ - und IgG^+ -Mitgliedern gefunden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine klonale Verwandtschaft zwischen $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen bestand und $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen frühe Abkömmlinge und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen spätere Abkömmlinge einer gemeinsamen Keimzentrumsreaktion sind (Seifert & Küppers, 2009).

Wenn in einer Keimzentrumsreaktion sowohl IgM^+ als auch IgG^+ Gedächtnis-B-Zellen aus einer naiven Gründerzelle entstehen können, muss eine klonale Verwandtschaft dieser Zellen nachweisbar sein. Solche putativen Klone verfügen über ein Muster gemeinsamer und individueller somatischer Mutationen. Da in der vorliegenden Arbeit 15% bei Spender 1 bzw. 6% bei Spender 2 aller IgM^+ -Sequenzen Klone mit IgG^+ - und IgM^+ -Mitgliedern zugeordnet werden konnten und gerade große Klone signifikant aus IgM^+ und IgG^+ B-Zellen bestanden, zeigt dies, dass $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen untereinander verwandt sind. Weiterhin zeigt das regelmäßige Auffinden von Klonmitgliedern mit nicht nur vielen Mutationen sondern auch mit nur wenigen oder gar keinen Mutationen im V_H -Gen, dass Gedächtnis-B-Zellen durchweg in Keimzentrumsreaktionen und nicht z.B. nur in der Endphase gebildet werden. Es zeigt ebenfalls, dass auch post-Keimzentrums-B-Zellen mit nur wenigen Mutationen existieren können, und nicht notwendigerweise aus Immunreaktionen ohne oder mit verminderter T-Zell-Hilfe stammen. Ebenfalls wird ersichtlich, dass der Klassenwechsel ein relativ frühes Ereignis im Verlauf einer Keimzentrumsreaktionen sein kann, wenn auch tendenziell IgG^+ -Klonmitglieder eher späte Abkömmlinge mit stärker mutierten V_H -Genen sind. Das impliziert, dass IgM^+ B-Zellen vornehmlich frühe Abkömmlinge derselben Keimzentrumsreaktionen wie klassische $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen sind, und liefert eine plausible Erklärung für ihre niedrigeren Mutationsfrequenzen.

In einigen Arbeiten wird die These vertreten, dass $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen aus dem Blut zirkulierende Marginalzonen-B-Zellen sind, keine Keimzentrumserfahrung haben und an Immunantworten gegen TI-Antigenen teilnehmen. Es ist zum einen nicht auszuschließen, dass $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen an Immunantworten teilnehmen, die gegen TI-Antigene gerichtet sind. Studien bei asplenischen Personen zeigten, dass nicht nur $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen sondern auch klassengewechselte B-Zellen gleichermaßen reduziert waren (Kruetzmann et al., 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch Marginalzonen-B-Zellen an einer Immunantwort gegen TD-Antigene teilnehmen können (Phan et al., 2005) und dass bei Immunantworten gegen TD-Antigene sowohl IgM^+ - als auch IgG^+ -sezernierende, antigenspezifische B-Zellen gefunden wurden (Fondere et al., 2003, Tuailon et al., 2006). Das Fazit zu einer TI-Generierung von somatischen Mutationen in $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen ist, dass eine Korrelation dieser Zellen mit einer verbesserten Immunantwort gegen TI-Antigene die vorliegenden Daten zu einer Generierung in TD-Immunantworten keineswegs ausschließt. Dies zeigt, dass zumindest ein Großteil der $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen aus gemeinsamen Keimzentrumsreaktionen mit $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen gegen TD-Antigene stammt.

Zum anderen wird die These vertreten, dass $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen ihre V-Gene durch primäre Diversifizierung mutieren. Es ist nicht auszuschließen, dass eine primäre Diversifizierung im Menschen stattfindet. Die Präsenz einer sehr kleinen Fraktion von geringfügig mutierten $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen in Hyper-IgM-Patienten oder asplenischen Personen ist kein Beweis für eine rudimentäre Diversifizierungsmaschinerie, die im Menschen allerhöchstens unter extremen Bedingungen wirksam ist. Es konnte in früheren Arbeiten sogar gezeigt werden, dass humane Marginalzonen-B-Zellen kein AID ausdrücken (Willenbrock et al., 2005).

Beide Diversifizierungsmuster sind nicht auszuschließen, aber da in der vorliegenden Arbeit klonal verwandte V_H -Gen-Sequenzen aus $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen gefunden wurden, ist dies ein formale Beweis für klonale Diversifizierungsmuster aus $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen, die ebenfalls in $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen existieren und dies ein Beweis für eine gemeinsame Herkunft aus TD-Keimzentrumsreaktionen ist. Weder die primäre Differenzierung einiger $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen noch ihre Beteiligung an TI-Immunantworten ist gänzlich auszuschließen. Die Daten in der vorliegenden Arbeit jedoch untermauern weiter die Hypothese (Seifert & Küppers, 2009), dass zumindest ein Großteil der $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen Gedächtnis-B-Zellen sind, da deren BCRs Affinitätsreifung erfahren haben und aufgrund gemeinsamer Mutationsmuster diese

IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B-Zellen Gedächtnis-B-Zellen früher als ihre klassengewechselten Verwandten das gemeinsame Keimzentrum verlassen haben.

4.3 Die IgG⁺ Gedächtnis-B-Zell-Populationen

Die IgG-Unterklassenverwendung der Gedächtnis-B-Zell-Populationen zeigten nicht nur spenderabhängige Unterschiede sondern auch Unterschiede zwischen den beiden IgG⁺-Populationen. IgG3 wurde häufiger bei der IgG⁺CD27⁻ B-Zell-Population gefunden, während IgG2 häufiger bei der IgG⁺CD27⁺ B-Zell-Population gefunden wurde. Die durchschnittliche Mutationsfrequenz der IgG-Unterklassen spiegelt die durchschnittliche Mutationsfrequenz der B-Zell-Population wider, wobei bei der IgG⁺CD27⁻ B-Zell-Population die durchschnittliche Mutationsfrequenz von IgG3 unter der von IgG1 und IgG2 lag. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Arbeiten (Wu et al., 2011) die ebenfalls feststellen konnten, dass die durchschnittliche Mutationsfrequenz der IgG-Unterklassen mit denen der jeweiligen B-Zell-Population übereinstimmte und die Mutationsfrequenz der IgG3⁺CD27⁻ B-Zell-Population unter der von IgG1 und IgG2 lag. Im Menschen ist IgG2 hauptsächlich gegen Polysaccharide reaktiv während IgG3 mit Proteinen reagiert und stärker am klassischen Weg der Komplementaktivierung und antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität beteiligt ist (Bruggemann et al., 1987). Daher lässt die unterschiedliche Verwendung von IgG2 und IgG3 der IgG⁺CD27⁻ und IgG⁺CD27⁺ B-Zell-Populationen vermuten, dass diese Zellen unterschiedlich sein könnten in Hinsicht auf die Natur des Antigens und der Wirkung der Immunantwort, wie das schon für die Rotavirus-spezifische B-Zell-Antwort gezeigt wurde (Jaimes et al., 2004). Betrachtete man nur die durchschnittliche Mutationsfrequenz klonal expandierte Sequenzen, so konnte gezeigt werden, dass die durchschnittliche Mutationsfrequenz beider Gedächtnis-B-Zell-Populationen von Klonen mit IgG⁺CD27⁻ und IgG⁺CD27⁺ Sequenzen sich weniger stark unterscheidet als bei Klonen mit Mitgliedern nur einer dieser Gedächtnis-B-Zell-Populationen. Die unterschiedliche Mutationsfrequenz bei Klonen mit IgG⁺CD27⁻ und IgG⁺CD27⁺ Sequenzen und bei Klonen reiner IgG⁺CD27⁻ Sequenzen zeigt, dass diese IgG⁺CD27⁻ B-Zellen aus reinen IgG⁺CD27⁻ Klone aus unterschiedlichen Immunreaktionen stammen können als IgG⁺CD27⁺ B-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Bäume mit zwei oder drei verschiedenen IgG-Unterklassen gefunden, die Mehrzahl der Bäume bestand jedoch aus einer IgG-Unterklasse. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Milieu im Keimzentrum einen Isotyp

dominierten lässt. Es ist in einigen Fällen auch möglich, dass eine Gedächtnis-B-Zelle wieder an einer erneuten Keimzentrumsreaktion teilnimmt und einen Klassenwechsel hin zu einer anderen IgG-Unterklasse vollzieht.

Die Population der IgG⁺CD27⁻ B-Zellen zeichnet sich ebenfalls durch eine im Vergleich zu anderen Gedächtnis-B-Zell-Populationen niedrigere CD40-Expression aus (Colonna-Romano et al., 2009). Das könnte erklären, warum diese Zellen eine durchschnittlich niedrigere Mutationsfrequenz aufweisen. Es konnte in früheren Arbeiten an Mäusen mit einer Entfernung von *Bcl6* spezifisch in B-Zellen gezeigt werden, dass Gedächtnis-B-Zellen früh nach einer Immunisierung mit einem TD-Antigen aus einer proliferativen Expansion Keimzentrumsunabhängig entstanden sind (Kaji et al., 2012). Diese Ergebnisse zeigen, dass unmutierte, klassengewechselte Gedächtnis-B-Zellen unabhängig von einer Keimzentrumsreaktion entstehen können. Es wäre denkbar, dass diese unmutierten IgG⁺CD27⁻ Gedächtnis-B-Zellen in der primären Fokusreaktion entstehen, noch bevor sich ein Keimzentrum gebildet hat.

Zusammengefasst konnten in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass IgG⁺CD27⁻ und IgG⁺CD27⁺ B-Zellen aus derselben Immunreaktion stammen können, da bei gemeinsamen Klonen deren Mutationsfrequenz ähnlicher war als wenn nur IgG⁺CD27⁻ B-Zellen in einem Klon gefunden wurden. Das zeigt, dass zumindest ein Teil der IgG⁺CD27⁻ B-Zellen aus gemeinsamen Immunreaktionen mit IgG⁺CD27⁺ B-Zellen stammen. Die unmutierten IgG⁺CD27⁻ B-Zellen können noch während der primären Fokusreaktion also keimzentrumsunabhängig gebildet werden. Bei den reinen IgG⁺CD27⁻ B-Zell-Klonen wäre es möglich, dass diese aus einer anderen Immunantwort als IgG⁺CD27⁺ B-Zellen stammen, aufgrund der unterschiedlichen Verwendung der IgG-Unterklassen, die oft spezifisch für die Natur eines Antigens ist.

4.4 Abschließende Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten humane Gedächtnis-B-Zellen weiter charakterisiert und Komposition und Komplexität der humanen Gedächtnis-B-Zell-Population analysiert werden. Es konnten 45% der analysierten Sequenzen Klonen zugeordnet werden und 15% aller IgM⁺-Sequenzen bei Spender 1 bzw. 6% aller IgM⁺-Sequenzen bei Spender 2 konnten Klonen mit IgG⁺- und IgM⁺-Mitgliedern zugeordnet werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Klongröße signifikant mit gemischten Klonen aus IgG⁺- und IgM⁺-Mitgliedern positiv korrelierte. Aufgrund gemeinsamer Klone und deren

Diskussion

Mutationsmuster konnte gezeigt werden, dass $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen mit $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen verwandt sind und früher als ihre klassengewechselten Verwandten das gemeinsame Keimzentrum verlassen haben und somit keimzentrumserfahren sind. Die durchschnittlich niedrigere Mutationsfrequenz der $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ B-Zell-Population in Vergleich zur $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zell-Population könnte eine kürzere Aufenthaltsdauer im Keimzentrum vermuten lassen. Anhand der klonalen Verwandtschaft von $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen konnte festgestellt werden, dass ein Großteil der $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen mit $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen verwandt sind und die unmutierten $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen möglicherweise während einer primären Fokusreaktion keimzentrunsumabhängig entstehen. Bei den reinen $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zell-Klonen wäre es möglich, dass diese aus einer anderen Immunantwort als $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen stammen, aufgrund der unterschiedlichen Verwendung der IgG-Unterklassen, die oft spezifisch für die Natur eines Antigens sind.

Zur weiteren Charakterisierung humaner Gedächtnis-B-Zellen sind weiterführende Studien nötig.

Da nicht nur die gesamte $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zell-Population die durchschnittlich niedrigste Mutationsfrequenz aufwies, sondern gerade unter den $\text{IgG3}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen die meisten unmutierten Sequenzen gefunden wurde, könnte eine Analyse von *BCL6* Mutationen die Frage klären, ob diese $\text{IgG3}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen Keimzentrumserfahrung haben. Dazu würde man die durchschnittliche Mutationsfrequenz von *BCL6* von drei verschiedenen Populationen analysieren: $\text{IgG3}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen, $\text{IgG1}^+\text{IgG2}^+\text{IgG4}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen, $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen. Je nachdem ob sich die beiden $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zell-Populationen zur $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zell-Population unterscheiden, kann eine Keimzentrumserfahrung der $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ Gedächtnis-B-Zell-Populationen vermutet werden.

Ein Schwachpunkt der vorliegenden Arbeit ist, dass die Gedächtnis-B-Zell-Populationen nicht antigenspezifisch analysiert wurden. Um Komposition und Komplexität humaner Gedächtnis-B-Zell-Populationen antigenspezifisch zu untersuchen, könnte man eine Massiv-Parallele-Sequenzierung der V_H -Gene humaner Gedächtnis-B-Zell-Populationen vor einer Immunisierung und 8 Tage danach analysieren und so das Repertoire der ersten post-Keimzentrum-B-Zellen untersuchen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die adaptive Immunität basiert auf der Rezeptorvielfalt durch zufällige Kombination von variablen Rezeptorsegmenten und paarweiser Zusammenlagerung verschiedener Rezeptorketten. Rezeptoren, die spezifisch Antigene erkennen (Antikörper), werden von B-Zellen produziert und als B-Zell-Rezeptoren bezeichnet. Naive B-Zellen wurden als IgM^+IgD^+ und CD27^- definiert, bei Kontakt mit Antigenen werden sie aktiviert, migrieren in die sekundären lymphatischen Organe und bilden dort ein Keimzentrum. Die Gedächtnis-B-Zellen, die das Keimzentrum verlassen, sind CD27^+ und können aufgrund des Isotyps ihres B-Zell-Rezeptors in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden: klassengewechselte (IgG , IgA oder IgE), IgM -only und IgM^+IgD^+ B-Zellen. Bei einigen B-Zellpopulationen ist die Zugehörigkeit zu den Gedächtnis-B-Zellen noch nicht final geklärt, entweder aufgrund ihres Isotyps ($\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$) oder aufgrund ihrer nicht vorhandenen CD27 Expression ($\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ / $\text{IgA}^+\text{CD27}^-$). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Komposition und Komplexität humaner Gedächtnis-B-Zell-Populationen aufzudecken. Zur Klärung dieser Fragen wurde mittels einer Massiv-parallelen-Sequenzierung der variablen Region der schweren Kette des B-Zell-Rezeptors von sortierten $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$, $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$, $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ und $\text{IgM}^+\text{onlyCD27}^+$ B-Zellen die klonale Zusammensetzung, Komplexität und Verwandtschaft analysiert. Die Auswertung der Daten ergab, dass 45% der analysierten Sequenzen Klonen zugeordnet werden konnten. 15% bei Spender 1 und 6% bei Spender 2 aller IgM^+ -Sequenzen wurden Klonen mit IgG^+ - und IgM^+ -Mitgliedern zugeordnet. Anhand von Mutationsanalysen konnten Rückschlüsse auf die Dynamik und möglichen Entstehungsszenarios von Gedächtnis-B-Zell-Klonen in Keimzentrumreaktionen mit spezifischen oder gemischten Subpopulationen gezogen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Klongröße signifikant mit Klonen aus IgG^+ - und IgM^+ -Mitgliedern zusammen hing. Aufgrund gemeinsamer Klone und deren Mutationsmustern konnte gezeigt werden, dass $\text{IgM}^+\text{IgD}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen und $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ Gedächtnis-B-Zellen verwandt sind und früher als ihre klassengewechselten Verwandten das gemeinsame Keimzentrum verlassen haben und somit keimzentrumserfahren sind. Durch Mutationsanalysen konnte festgestellt werden, dass ein Großteil der $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen mit $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen verwandt sind und die unmutierten $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zellen vermutlich während der primären Fokusreaktion keimzentrumsunabhängig entstehen. Bei reinen $\text{IgG}^+\text{CD27}^-$ B-Zell-Klonen wäre es möglich, dass diese aus einer anderen Immunantwort als $\text{IgG}^+\text{CD27}^+$ B-Zellen stammen, aufgrund der unterschiedlichen Verwendung der IgG -Unterklassen, die oft spezifisch für die Natur eines Antigens sind.

LITERATURVERZEICHNIS

6.1 Zeitschriftenaufsätze

- 1.) AGEMATSU, K., KOBATA, T., SUGITA, K., HIROSE, T., SCHLOSSMAN, S. F. & MORIMOTO, C. 1995. Direct cellular communications between CD45R0 and CD45RA T cell subsets via CD27/CD70. *J Immunol*, 154, 3627-35.
- 2.) AGEMATSU, K., NAGUMO, H., YANG, F. C., NAKAZAWA, T., FUKUSHIMA, K., ITO, S., SUGITA, K., MORI, T., KOBATA, T., MORIMOTO, C. & KOMIYAMA, A. 1997. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol*, 27, 2073-9.
- 3.) AGEMATSU, K., NAGUMO, H., SHINOZAKI, K., HOKIBARA, S., YASUI, K., TERADA, K., KAWAMURA, N., TOBA, T., NONOYAMA, S., OCHS, H. D. & KOMIYAMA, A. 1998. Absence of IgD-CD27(+) memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. *J Clin Invest*, 102, 853-60.
- 4.) AGGARWAL, B. B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 3, 745-56.
- 5.) ARNAOUT, R., LEE, W., CAHILL, P., HONAN, T., SPARROW, T., WEIAND, M., NUSBAUM, C., RAJEWSKY, K. & KORALOV, S. B. 2011. High-resolution description of antibody heavy-chain repertoires in humans. *PLoS One*, 6, e22365.
- 6.) BARAK, M., ZUCKERMAN, N. S., EDELMAN, H., UNGER, R. & MEHR, R. 2008. IgTree: creating Immunoglobulin variable region gene lineage trees. *J Immunol Methods*, 338, 67-74.
- 7.) BLACK, S. J., VAN DER LOO, W., LOKEN, M. R. & HERZENBERG, L. A. 1978. Expression of IgD by murine lymphocytes. Loss of surface IgD indicates maturation of memory B cells. *J Exp Med*, 147, 984-96.
- 8.) BRAUNINGER, A., GOOSSENS, T., RAJEWSKY, K. & KÜPPERS, R. 2001. Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol*, 31, 3631-7.
- 9.) BRINEY, B. S., WILLIS, J. R., MCKINNEY, B. A. & CROWE, J. E., JR. 2012. High-throughput antibody sequencing reveals genetic evidence of global regulation of the naive and memory repertoires that extends across individuals. *Genes Immun*, 13, 469-73.
- 10.) BRUGGEMANN, M., WILLIAMS, G. T., BINDON, C. I., CLARK, M. R., WALKER, M. R., JEFFERIS, R., WALDMANN, H. & NEUBERGER, M. S. 1987. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med*, 166, 1351-61.

- 11.) CHEN, L., PERLINA, A. & LEE, C. J. 2004. Positive selection detection in 40,000 human immunodeficiency virus (HIV) type 1 sequences automatically identifies drug resistance and positive fitness mutations in HIV protease and reverse transcriptase. *J Virol*, 78, 3722-32.
- 12.) COLONNA-ROMANO, G., BULATI, M., AQUINO, A., PELLICANO, M., VITELLO, S., LIO, D., CANDORE, G. & CARUSO, C. 2009. A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech Ageing Dev*, 130, 681-90.
- 13.) DUNN-WALTERS, D. K., ISAACSON, P. G. & SPENCER, J. 1995. Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med*, 182, 559-66.
- 14.) FECTEAU, J. F., COTE, G. & NERON, S. 2006. A new memory CD27-IgG+ B cell population in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J Immunol*, 177, 3728-36.
- 15.) FEDDERSEN, R. M. & VAN NESS, B. G. 1985. Double recombination of a single immunoglobulin kappa-chain allele: implications for the mechanism of rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4793-7.
- 16.) FONDERE, J. M., HUGUET, M. F., YSSEL, H., BAILLAT, V., REYNES, J., VAN DE PERRE, P. & VENDRELL, J. P. 2003. Detection of peripheral HIV-1-specific memory B cells in patients untreated or receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS*, 17, 2323-30.
- 17.) FUKITA, Y., JACOBS, H. & RAJEWSKY, K. 1998. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity*, 9, 105-14.
- 18.) IWASATO, T., SHIMIZU, A., HONJO, T. & YAMAGISHI, H. 1990. Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell*, 62, 143-9.
- 19.) JACOB, J., KELSOE, G., RAJEWSKY, K. & WEISS, U. 1991. Intracloal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*, 354, 389-92.
- 20.) JAIMES, M. C., ROJAS, O. L., KUNKEL, E. J., LAZARUS, N. H., SOLER, D., BUTCHER, E. C., BASS, D., ANGEL, J., FRANCO, M. A. & GREENBERG, H. B. 2004. Maturation and trafficking markers on rotavirus-specific B cells during acute infection and convalescence in children. *J Virol*, 78, 10967-76.
- 21.) JOLLY, C. J., WAGNER, S. D., RADA, C., KLIX, N., MILSTEIN, C. & NEUBERGER, M. S. 1996. The targeting of somatic hypermutation. *Semin Immunol*, 8, 159-68.

- 22.) KAJI, T., FURUKAWA, K., ISHIGE, A., TOYOKURA, I., NOMURA, M., OKADA, M., TAKAHASHI, Y., SHIMODA, M. & TAKEMORI, T. 2013. Both mutated and unmutated memory B cells accumulate mutations in the course of the secondary response and develop a new antibody repertoire optimally adapted to the secondary stimulus. *Int Immunol*, 25, 683-95.
- 23.) KAJI, T., ISHIGE, A., HIKIDA, M., TAKA, J., HIJIKATA, A., KUBO, M., NAGASHIMA, T., TAKAHASHI, Y., KUROSAKI, T., OKADA, M., OHARA, O., RAJEWSKY, K. & TAKEMORI, T. 2012. Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. *J Exp Med*, 209, 2079-97.
- 24.) KATAOKA, T., MIYATA, T. & HONJO, T. 1981. Repetitive sequences in class-switch recombination regions of immunoglobulin heavy chain genes. *Cell*, 23, 357-68.
- 25.) KLEIN, U., KÜPPERS, R. & RAJEWSKY, K. 1997. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood*, 89, 1288-98.
- 26.) KLEIN, U., GOOSSENS, T., FISCHER, M., KANZLER, H., BRAEUNINGER, A., RAJEWSKY, K. & KUPPERS, R. 1998a. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev*, 162, 261-80.
- 27.) KLEIN, U., RAJEWSKY, K. & KÜPPERS, R. 1998b. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med*, 188, 1679-89.
- 28.) KLEIN, U. & DALLA-FAVERA, R. 2008. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*, 8, 22-33.
- 29.) KROESE, F. G., TIMENS, W. & NIEUWENHUIS, P. 1990. Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. *Curr Top Pathol*, 84 (Pt 1), 103-48.
- 30.) KRUETZMANN, S., ROSADO, M. M., WEBER, H., GERMING, U., TOURNILHAC, O., PETER, H. H., BERNER, R., PETERS, A., BOEHM, T., PLEBANI, A., QUINTI, I. & CARSETTI, R. 2003. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med*, 197, 939-45.
- 31.) KÜPPERS, R., ZHAO, M., RAJEWSKY, K. & HANSMANN, M. L. 1993. Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 143, 230-9.
- 32.) MANIS, J. P., TIAN, M. & ALT, F. W. 2002. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol*, 23, 31-9.

- 33.) MAURER, D., FISCHER, G. F., FAE, I., MAJDIC, O., STUHLMEIER, K., VON JENEY, N., HOLTER, W. & KNAPP, W. 1992. IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27+ B lymphocyte subset. *J Immunol*, 148, 3700-5.
- 34.) MOND, J. J., LEES, A. & SNAPPER, C. M. 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol*, 13, 655-92.
- 35.) MROCZEK, E. S., IPPOLITO, G. C., ROGOSCH, T., HOI, K. H., HWANGPO, T. A., BRAND, M. G., ZHUANG, Y., LIU, C. R., SCHNEIDER, D. A., ZEMLIN, M., BROWN, E. E., GEORGIU, G. & SCHROEDER, H. W., JR. 2014. Differences in the composition of the human antibody repertoire by B cell subsets in the blood. *Front Immunol*, 5, 96.
- 36.) MURAMATSU, M., KINOSHITA, K., FAGARASAN, S., YAMADA, S., SHINKAI, Y. & HONJO, T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102, 553-63.
- 37.) PASQUALUCCI, L., MIGLIAZZA, A., FRACCHIOLLA, N., WILLIAM, C., NERI, A., BALDINI, L., CHAGANTI, R. S., KLEIN, U., KÜPPERS, R., RAJEWSKY, K. & DALLA-FAVERA, R. 1998. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11816-21.
- 38.) PETERSEN-MAHRT, S. K., HARRIS, R. S. & NEUBERGER, M. S. 2002. AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*, 418, 99-103.
- 39.) PHAM, P., BRANSTEITTER, R., PETRUSKA, J. & GOODMAN, M. F. 2003. Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature*, 424, 103-7.
- 40.) PHAN, T. G., GARDAM, S., BASTEN, A. & BRINK, R. 2005. Altered migration, recruitment, and somatic hypermutation in the early response of marginal zone B cells to T cell-dependent antigen. *J Immunol*, 174, 4567-78.
- 41.) PREUD'HOMME, J. L., PETIT, I., BARRA, A., MOREL, F., LECRON, J. C. & LELIEVRE, E. 2000. Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol Immunol*, 37, 871-87.
- 42.) RADA, C. & MILSTEIN, C. 2001. The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *Embo Journal*, 20, 4570-4576.
- 43.) RAJEWSKY, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381, 751-8.

- 44.) ROGOZIN, I. B. & DIAZ, M. 2004. Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol*, 172, 3382-4.
- 45.) SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- 46.) SEIFERT, M. & KÜPPERS, R. 2009. Molecular footprints of a germinal center derivation of human IgM+(IgD+)CD27+ B cells and the dynamics of memory B cell generation. *J Exp Med*, 206, 2659-69.
- 47.) SHEN, H. M., PETERS, A., BARON, B., ZHU, X. & STORB, U. 1998. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science*, 280, 1750-2.
- 48.) SONG, H. & CERNY, J. 2003. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med*, 198, 1923-35.
- 49.) TIEGS, S. L., RUSSELL, D. M. & NEMAZEE, D. 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med*, 177, 1009-20.
- 50.) TOELLNER, K. M., JENKINSON, W. E., TAYLOR, D. R., KHAN, M., SZE, D. M., SANSOM, D. M., VINUESA, C. G. & MACLENNAN, I. C. 2002. Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers. *J Exp Med*, 195, 383-9.
- 51.) TOYAMA, H., OKADA, S., HATANO, M., TAKAHASHI, Y., TAKEDA, N., ICHII, H., TAKEMORI, T., KURODA, Y. & TOKUHISA, T. 2002. Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity*, 17, 329-39.
- 52.) TUAILLON, E., TABAA, Y. A., PETITJEAN, G., HUGUET, M. F., PAJEAUX, G., FONDERE, J. M., PONSEILLE, B., DUCOS, J., BLANC, P. & VENDRELL, J. P. 2006. Detection of memory B lymphocytes specific to hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) from HBsAg-vaccinated or HBV-immunized subjects by ELISPOT assay. *J Immunol Methods*, 315, 144-52.
- 53.) WAGNER, S. D. & NEUBERGER, M. S. 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol*, 14, 441-57.
- 54.) WEILL, J. C., WELLER, S. & REYNAUD, C. A. 2004. A bird's eye view on human B cells. *Semin Immunol*, 16, 277-81.

- 55.) WEISS, U. & RAJEWSKY, K. 1990. The repertoire of somatic antibody mutants accumulating in the memory compartment after primary immunization is restricted through affinity maturation and mirrors that expressed in the secondary response. *J Exp Med*, 172, 1681-9.
- 56.) WELLER, S., FAILI, A., GARCIA, C., BRAUN, M. C., LE DEIST, F. F., DE SAINT BASILE, G. G., HERMINE, O., FISCHER, A., REYNAUD, C. A. & WEILL, J. C. 2001. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1166-70.
- 57.) WELLER, S., BRAUN, M. C., TAN, B. K., ROSENWALD, A., CORDIER, C., CONLEY, M. E., PLEBANI, A., KUMARARATNE, D. S., BONNET, D., TOURNILHAC, O., TCHERNIA, G., STEINIGER, B., STAUDT, L. M., CASANOVA, J. L., REYNAUD, C. A. & WEILL, J. C. 2004. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*, 104, 3647-54.
- 58.) WELLER, S., REYNAUD, C. A. & WEILL, J. C. 2005. Splenic marginal zone B cells in humans: where do they mutate their Ig receptor? *Eur J Immunol*, 35, 2789-92.
- 59.) WELLER, S., MAMANI-MATSUDA, M., PICARD, C., CORDIER, C., LECOEUCE, D., GAUTHIER, F., WEILL, J. C. & REYNAUD, C. A. 2008. Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM+ IgD+ CD27+ B cell repertoire in infants. *J Exp Med*, 205, 1331-42.
- 60.) WILLENBROCK, K., JUNGNICHEL, B., HANSMANN, M. L. & KUPPERS, R. 2005. Human splenic marginal zone B cells lack expression of activation-induced cytidine deaminase. *Eur J Immunol*, 35, 3002-7.
- 61.) WU, Y. C., KIPLING, D., LEONG, H. S., MARTIN, V., ADEMOKUN, A. A. & DUNN-WALTERS, D. K. 2010. High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood*, 116, 1070-8.
- 62.) WU, Y. C., KIPLING, D. & DUNN-WALTERS, D. K. 2011. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front Immunol*, 2, 81.
- 63.) WUERFFEL, R. A., DU, J., THOMPSON, R. J. & KENTER, A. L. 1997. Ig Sgamma3 DNA-specific double strand breaks are induced in mitogen-activated B cells and are implicated in switch recombination. *J Immunol*, 159, 4139-44.
- 64.) YUAN, J., AMEND, A., BORKOWSKI, J., DEMARCO, R., BAILEY, W., LIU, Y., XIE, G. & BLEVINS, R. 1999. MULTICLUSTAL: a systematic method for surveying Clustal W alignment parameters. *Bioinformatics*, 15, 862-3.

- 65.) ZHANG, Z., ZEMLIN, M., WANG, Y. H., MUNFUS, D., HUYE, L. E., FINDLEY, H. W., BRIDGES, S. L., ROTH, D. B., BURROWS, P. D. & COOPER, M. D. 2003.
Contribution of Vh gene replacement to the primary B cell repertoire. *Immunity*, 19, 21-31.

6.2 Bücher

- 66.) JANEWAY, C. A. T., P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. 2002.
Immunologie
Heidelberg; Berlin,
Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Einleitung

Abb.: 1.1 Expression des B-Zell-Rezeptors	8
Abb.: 1.2 Keimzentrumsreaktion	11
Abb.: 1.3 Gedächtnis-B-Zellpopulationen	14

Material und Methoden

Abb.: 2.1 Sortierschema	24
Abb.: 2.2 Herstellung der Amplicon Library	32
Abb.: 2.3 Schema des Roche 454 GS FLX+ Systems	34
Abb.: 2.4 Sequenzen der IgG-Unterklassen	35

Ergebnisse

Abb.: 3.1 Zellsortier-Schema und Reinheitskontrolle der Zellsortierung	38
Abb.: 3.2 Längenverteilung der Reads	40
Abb.: 3.3 Nutzung der V _H -Gene	44
Abb.: 3.4 Nutzung der V _H -Gene	47
Abb.: 3.5 CDRIII-Länge	48
Abb.: 3.6 Durchschnittliche Mutationsfrequenz der Gedächtnis-B-Zell-Populationen	49
Abb.: 3.7 Mutationsverteilung der Gedächtnis-B-Zell-Populationen	50
Abb.: 3.8 Verteilung der Sequenzen für Spender 1 und Spender 2	52
Abb.: 3.9 Klongröße und klonale Komposition kombiniert aus zwei Spendern	55
Abb.: 3.10 Mutationsbäume der Gedächtnis-B-Zell-Klone aus beiden Spendern	57
Abb.: 3.11 Klonale Baumstrukturen kombiniert aus zwei Spendern	58
Abb.: 3.12 Anzahl der IgG-Unterklassen pro Klon	59
Abb.: 3.13 Verteilung der IgG-Unterklassen	60
Abb.: 3.14 Durchschnittliche Mutationsfrequenz der IgG-Unterklassen	61
Abb.: 3.15 Mutationsverteilung der IgG-Unterklassen	62
Abb.: 3.16 Verteilung der IgG-Unterklassen der unmutierten IgG ⁺ CD27 ⁻	63
Abb.: 3.16 Mutationsfrequenz der IgG-Unterklassen	64

TABELLENVERZEICHNIS

Ergebnisse

Tab.: 3.1 Sequenzanzahl der Rohdaten	39
Tab.: 3.2 Anzahl 100% identischer Reads	42
Tab.: 3.3 Sequenzanzahl der Replikate	43
Tab.: 3.4 Nutzung der V _H -Gene	46
Tab.: 3.5 K _a /K _s -Werte	51
Tab.: 3.6 Anzahl der Sequenzen an expandierten Klonen	53
Tab.: 3.7 Anzahl der gefundenen Klone	54

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC (als Farbstoff)	Allophycocyanin
APC (als Zelltyp)	professionelle Antigen präsentierende Zelle
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Rinderserum-Albumin
C	konstante Region der Ig-Ketten
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre oder Kopie-DNA
CDR	Komplementarität bestimmende Region
C _H	konstante Region der schweren Kette
dd H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
D _H	Diversitäts-Gensegment der schweren Kette
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxy-Nukleotid-Triphosphate
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	et altera (lat. und andere)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
FDC	follikuläre dendritische Zelle
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FR	Gerüstregion
g	Gramm / Maßeinheit für die Masse
GC	Keimzentrum
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin schwere Ketten Locus
IGHV	V-Region der schweren Kette
Igκ	Immunglobulin leichtketten κ-Locus
Igλ	Immunglobulin leichtketten λ-Locus
J _H	Verbindungs-Gensegment der schweren Kette
J _L	Verbindungs-Gensegment der leichten Kette
kb	Kilobasen

l	Liter / Einheit für das Volumen
lat.	lateinisch
M	Molarität / Stoffmengenkonzentration
m	ein Tausendstel als Vorsatz einer Maßeinheit
MACS	Magnetismus-assoziierte Zellsortierung
MGZ	Marginalzone
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Protein (Typ I und II)
Min.	Minuten
mol	Basiseinheit der Stoffmenge
n	ein Milliardstel als Vorsatz einer Maßeinheit
N-Nukleotid	nicht keimbahnkodiertes Nukleotid
PB	periphere Blut
PBMC	Mononukleäre Zellen aus PB
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RAG1/2	Enzymkomplex für V(D)J-Rekombination
RIN	RNA-Integritäts-Nummer (RNA-Qualität)
RNA	Ribonukleinsäure
RSS	Rekombinationssignalsequenz
RT	reverse Transkription
SHM	somatische Hypermutation
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TD	T-Zell-abhängig
TI	T-Zell-unabhängig
Tris	Trisamin (Base)
U	Units: Enzymeinheit
μ	ein Millionstel als Vorsatz einer Maßeinheit
V _H	Variables Gensegment der schweren Kette
V _L	Variables Gensegment der leichten Kette
xg	Zentrifugalgeschwindigkeit

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Ralf Küppers und Dr. Marc Seifert für ihre hervorragende Betreuung, ihre stetige Diskussionsbereitschaft und ihre große Geduld.

Auch Kerstin Heise, Sara Taudien und Martina Przekopowicz möchte ich herzlich danken für ihre herausragende Unterstützung meiner Arbeit und eine freundschaftliche Zusammenarbeit.

Danken möchte ich ebenso Dr. René Scholtysik für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Auch Klaus Lennartz bin ich für seine Unterstützung bei Zellsortierungen und eine freundschaftliche Zusammenarbeit sehr verbunden.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern der AG Küppers für eine herzliche und abwechslungsreiche Arbeitsatmosphäre danken. Wie werde ich Euch vermissen!

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten